



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Efectos de la aplicación de un bioestimulante derivado de *Ascophyllum nodosum* en la composición fenólica de uvas y vinos de las variedades Tempranillo tinto y blanco

Autor/es

BIANCA SOUZA DA COSTA

Director/es

CARMEN TENORIO RODRÍGUEZ y TERESA GARDE CERDÁN ,

Facultad

Escuela de Máster y Doctorado de la Universidad de La Rioja

Titulación

Máster Universitario en Química y Biotecnología

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2017-18



Efectos de la aplicación de un bioestimulante derivado de *Ascophyllum nodosum* en la composición fenólica de uvas y vinos de las variedades *Tempranillo tinto y blanco*, de BIANCA SOUZA DA COSTA

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE MÁSTER
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
MASTER EN QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**Efectos de la aplicación de un bioestimulante
derivado de *Ascophyllum nodosum* en la
composición fenólica de uvas y vinos de las
variedades Tempranillo tinto y blanco**



Bianca Souza da Costa

Tutores: Teresa Garde Cerdán

Carmen Tenorio Rodríguez

CURSO 2017/2018

AGRADECIMENTOS

Transcurridos estos meses, quisiera expresar mi profunda gratitud a todas las personas que de alguna forma contribuyeron a la realización y finalización de este ciclo profesional.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis padres, Ilda y Daniel, porque sin ellos no sería posible llegar hasta aquí. Agradezco todo el apoyo y amor que me conceden, ya que, a pesar de la distancia física, que es constante hace muchos años, siempre me están apoyando y animando a seguir luchando por mis sueños. Y por mostrarme que la educación es una herramienta transformadora. ¡Esta victoria es de ustedes!

Dejo aquí mi sincero agradecimiento a mis tutoras, Teresa Garde y Carmen Tenorio, por la orientación y por la posibilidad de descubrir el ambiente de investigación en viticultura y enología, con un tema nuevo y desafiante para mí, pero que se ha vuelto tan agradable y que me ha posibilitado mucho aprendizaje acerca del fascinante mundo de la química de vinos.

Agradezco a la Asociación Universitaria Iberoamericana de Posgrado (AUIP), el Gobierno de La Rioja y la Universidad de La Rioja por la financiación de este estudio y la concesión de la beca para cursar el máster.

Agradezco al grupo VIENAP, en especial a Teresa Garde, por su orientación, y constante atención y apoyo, siempre dispuesta a compartir sus conocimientos. Además de su postura siempre muy ética y profesional, ya la vez muy cercana y amable con todos los que están a su alrededor. ¡Gracias por ser un ejemplo de profesional y persona! Estoy muy agradecida también por las enseñanzas y convivencia compartidas con Pilar Rubio. Agradezco también a Miriam, por enseñarme y ayudarme con los análisis en HPLC. Soy grata a Gastón por la divertida convivencia en laboratorio y amistad, además de la ayuda para revisar el trabajo. También Eva Pilar, Vanesa Estepa y Sandro, por los momentos de convivencia, sea en el laboratorio o en la hora del café, tornándonos más felices. Así mismo, a los demás compañeros y funcionarios de ICSV, gracias, pues cada uno ha contribuido para una estancia muy agradable en el ICSV.

También, estoy muy agradecida a la Familia latinoamericana que Logroño me dio: Fátima, Gastón, Karina, Kathe, Leticia, Lili y Luis. Me siento muy afortunada porque nuestros caminos se han cruzado. La convivencia y amistad de ustedes ha sido fundamental para la conclusión de cada etapa de este máster. Sin duda ustedes serán los recuerdos más bonitos y felices de ese tiempo por aquí. ¡Vuelvo a Brasil con un poco de cada uno de ustedes!

Por supuesto, tengo mucho que agradecer a mis grandes amigas: Angélica, Gislaine, Ivelize, Jocysane, Luiza, Lulu, Marilea y Rafaela. Por la amistad de tantos años, por los consejos, apoyo e incentivo durante esta trayectoria fuera de Brasil, y que a pesar de la distancia siempre se hacen presentes en todo momento.

Finalmente, dejo mi agradecimiento a todos que de alguna forma contribuyeron para realización de este trabajo ¡Gracias!

¡Muchas gracias a todos!

A mis padres, Ilda y Daniel

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	7
LISTADO DE TABLAS.....	8
LISTADO DE ABREVIACIONES.....	9
RESUMEN	11
ABSTRACT.....	12
1. Introducción	13
1.1. Composición fenólica de uvas y vinos	13
1.1.1. Compuestos flavonoideos	15
1.1.1.1. Antocianos	16
1.1.1.2. Flavanoles	17
1.1.1.3. Flavonoles	18
1.1.2. Compuestos no flavonoideos.....	19
1.1.2.1. Ácidos hidroxibenzoicos	20
1.1.2.2. Ácidos hidroxicinámicos	21
1.1.2.3. Estilbenos	22
1.2. Aplicación de bioestimulantes en el viñedo	23
2. Objetivos	25
3. Material y métodos	25
3.1. Tratamientos	25
3.2. Proceso de vinificación.....	25
3.3. Parámetros generales de las uvas y de los vinos.....	26
3.4. Determinación de los compuestos fenólicos en uva y vino	27
3.4.1. Preparación de la muestra para determinar los compuestos fenólicos.....	27
3.4.2. Análisis de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD.....	28
3.5. Análisis estadístico.....	29
4. Resultados y discusión	31
4.1. Parámetros generales	31
4.1.1. Uva y vino de Tempranillo tinto	31

4.1.2	Uva y vino de Tempranillo blanco	34
4.2.	Composición fenólica de uvas y vinos	36
4.2.1.	Variedad Tempranillo blanco	37
4.2.1.1.	Efecto sobre los antocianos en uva y vino de Tempranillo tinto	37
4.2.1.2.	Efecto sobre los otros compuestos flavonoideos en uva y vino de Tempranillo tinto.....	41
4.2.1.3.	Efecto sobre los compuestos no flavonoideos en uva y vino Tempranillo tinto...	44
4.2.2.	Variedad Tempranillo blanco	48
4.2.2.1.	Efecto sobre los compuestos flavonoideos en uva y vino de Tempranillo blanco.....	48
4.2.2.2.	Efecto sobre los compuestos no flavonoideos en uva y vino de Tempranillo blanco.....	52
5.	Conclusiones	55
6.	Bibliografía	57
ANEXO I – Cromatogramas de los compuestos fenólicos obtenidos por HPLC-DAD a distintas longitudes de onda.		63

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de los flavonoides	15
Figura 2. Estructura de los antocianos en uvas y vinos	16
Figura 3. Los flavanoles más abundantes en uvas y vinos	18
Figura 4. Estructura de los flavonoles.	19
Figura 5. Estructura de los principales ácidos hidroxibenzoicos.....	20
Figura 6. Estructura de los principales ácidos hidroxicinámicos en uvas y vinos.	21
Figura 7. Estilbenos presentes en uvas y vinos.	23
Figura 8. Perfil de antocianos en uva y vino de las vides de Tempranillo tinto control y tratadas con extracto de algas.	39
Figura 9. Concentración de flavonoles totales en uva y vino de las vides de Tempranillo tinto control y tratadas con extracto de alga.	43
Figura 10. Concentración de compuestos no flavonoideos en uva y vino de las vides de Tempranillo tinto control y tratadas con extracto de algas.....	46
Figura 11. Concentración de flavonoles totales en uva de las vides de Tempranillo blanco control y tratadas con extracto de alga.	51
Figura 12. Concentración de no flavonoides totales en uva y vino de las vides de Tempranillo blanco control y tratadas con extracto de alga.....	54

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Gradiente de elución empleado para el análisis por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos.	28
Tabla 2. Datos de calibración usados para la cuantificación por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos.	29
Tabla 3. Parámetros enológicos de las bayas de Tempranillo tinto de las vides control y de las vides tratados con extracto de algas.	32
Tabla 4. Parámetros enológicos de los vinos de Tempranillos tintos de las vides control y de las vides tratados con extracto de algas.	33
Tabla 5. Parámetros enológicos de las bayas de Tempranillo blanco de las vides control y de las vides tratados con extracto de algas.	35
Tabla 6. Parámetros enológicos los vinos de Tempranillos blancos de las vides control y de las vides tratados con extracto de algas.	36
Tabla 7. Contenido de antocianos en las muestras de Tempranillo tinto control y tratadas con extracto de algas.	38
Tabla 8. Contenido de flavanoles y flavonoles en las muestras de Tempranillo tinto control y tratadas con extracto de algas.	42
Tabla 9. Contenido de compuestos no flavonoideos en muestras de vides de Tempranillo tinto control y tratadas con extracto de algas.	45
Tabla 10. Contenido de flavanoles y flavonoles en muestras de vides de Tempranillo blanco control y tratadas con extracto de algas.	49
Tabla 11. Contenido de no flavonoides en muestras de vides de Tempranillo blanco control y tratadas con extracto de algas.	53

LISTADO DE ABREVIACIONES

HPLC-DAD: cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de diodos

°C: grado centígrado

g: gramos

hL: hectolitro

IPT: índice de polifenoles totales

Kg: kilogramo

L: litro

µg: microgramo

µl: microlitro

mL: mililitro

min: minutos

nm: nanómetro

N: nitrógeno

NFA: nitrógeno fácilmente asimilable

OIV: Organización Internacional de la Viña y del Vino

rpm: revoluciones por minuto

tr : tiempo de retención

UV-Vis: Ultravioleta visible

v/v: volumen / volumen

et al.: y colaboradores

RESUMEN

Debido a las nuevas reglamentaciones a nivel mundial, el sector de la vitivinicultura está adaptando paulatinamente prácticas agrícolas más sostenibles y respetuosas con el medioambiente. Dentro de ellas, la aplicación de bioestimulantes orgánicos se está empleando como una alternativa a la fertilización tradicional con el fin de corregir pequeñas deficiencias evitando así el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados y los efectos nocivos de su lixiviación. Dentro de los bioestimulantes usados, los extractos de algas, tales como *Ascophyllum nodosum*, presentan resultados muy prometedoras, permitiendo la mejora de la productividad y la calidad de los frutos. La composición fenólica de las uvas tiene un impacto directo en las características sensoriales y tecnológicas de los vinos, además de presentar efectos positivos para la salud humana. Basado en lo expuesto anteriormente, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la aplicación foliar de dos concentraciones distintas del extracto de algas *Ascophyllum nodosum*, en la composición fenólica de uvas y vinos provenientes de vides de las variedades Tempranillo tinto y blanco. Los tratamientos se aplicaron en dos momentos, uno durante el envero y otro una semana después, utilizando una dosis baja (0,25 % v/v) y otra alta (0,5 % v/v) de un extracto comercial de algas. El tratamiento consistió en aplicar 200 mL del extracto de alga en cada planta. Los tratamientos se llevaron a cabo mediante un diseño experimental aleatorio, realizándose cada tratamiento por triplicado. A partir de las uvas tratadas y del ensayo control se elaboraron los correspondientes vinos. Se evaluaron los parámetros enológicos de las uvas y de los vinos de acuerdo a los métodos oficiales y también se analizó el contenido de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados mostraron que la aplicación del extracto de algas afectó a la síntesis de compuestos fenólicos de forma distinta para cada variedad de uva. En la variedad Tempranillo tinto, el tratamiento con *A. nodosum* en dosis baja resultó en un incremento de la síntesis de antocianos, mientras que la dosis alta implicó una síntesis de mayores concentraciones de estilbenos. En las uvas Tempranillo blanco, la aplicación del bioestimulante en dosis alta aumentó el contenido de flavonoides y de los ácidos hidroxicinámicos, mientras que la dosis baja resultó en una disminución de la síntesis de estos compuestos. A partir de los resultados obtenidos en los vinos, se observó que la aplicación de ambas dosis del extracto de algas no afectó ni a los parámetros enológicos ni a la composición fenólica de los vinos. Este es el primer estudio que evalúa el efecto de la aplicación de extractos de algas en vides de Tempranillo tinto y blanco en la composición fenólica de las uvas y de los vinos. Los resultados revelan que la bioestimulación de vides a partir de aplicaciones de extractos de algas puede ser una herramienta para optimizar la calidad y la composición fenólica de uvas y vinos.

ABSTRACT

Due to new regulations at global level, the viticulture sector is gradually adapting more sustainable and environmentally friendly farming practices. Among them, the application of organic biostimulants has been used as an alternative to the traditional fertilization in order to correct small nutritional deficiencies in plants avoiding the excessive use of nitrogen fertilizers and the harmful effects of their leaching. Among the biostimulants used, seaweed extracts, such as *Ascophyllum nodosum*, present very promising results, allowing the improvement of productivity and fruit quality in crop plants. The grape phenolic composition has a direct impact on sensorial and technological characteristics of wines, in addition to present positive effects for human health. Based on the aforementioned, the aim of this work was to study the effect of foliar application of the *Ascophyllum nodosum* seaweed extract, at two different concentrations, on phenolic composition of grapes and wines from Tempranillo tinto and blanco varieties. The treatments were applied at two times, veraison and one week later, using a low (0.25% v/v) and a high (0.5% v/v) dosage of a commercial seaweed extract. The treatments per plant consisted of applying 200 mL of each plant. The treatments were arranged in a randomized experimental design and disposed in triplicate in the field. From the grapes treated and control their corresponding wines were made. The oenological parameters of grapes and wines were evaluated according to official methods and the content of phenolic compounds was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the application of seaweed extract affected differently the synthesis of phenolic compounds for each grape variety. In the Tempranillo tinto variety, the low-dose of *A. nodosum* resulted in an increase in the synthesis of anthocyanins, while the high dose involved a synthesis of higher concentrations of stilbenes. In the Tempranillo blanco grapes, the application of the biostimulant in the high dose increased the content of flavonoids and hydroxycinnamic acids in grapes, while the low dose treatment resulted in a decrease of the synthesis of these compounds. From the results obtained in the wines, it seems that the application of both doses of the seaweed extract did not affect the wine parameters or their phenolic composition. This is the first study that evaluates the effect of the application of seaweed extracts to Tempranillo tinto and blanco vines on phenolic composition of grapes and wines. These results reveal that the biostimulation of vines from seaweed applications can be a tool to optimize the quality and phenolic composition of grapes and wines.

1. Introducción

En España el mercado del vino está en constante expansión y el estudio de estrategias para mejorar la productividad del viñedo y la calidad del vino producido, siguen siendo objeto de investigación. Durante el año 2016, el consumo de vino tinto en España llegó a 98,6 millones de litros, mientras que el de vino blanco fue de 63 millones de litros (Mercasa, 2017). A pesar de que el consumo de vino tinto lidera las ventas del mercado nacional, el consumo de vinos blancos también es de gran importancia para el sector vitivinícola español.

Actualmente la viticultura a nivel mundial se está centrando en adaptar prácticas de manejo para optimizar la calidad de la uva y de los vinos de una manera más sustentable con el medioambiente. En este sentido, el empleo de bioestimulantes orgánicos puede ser una alternativa para mejorar la composición de los vinos, en especial el contenido de compuestos fenólicos (Khan et al., 2012; Frioni et al., 2018). Estos compuestos tienen impacto directo en las características organolépticas de los vinos, además trabajos recientes han mostrado que su consumo tiene un efecto positivo para la salud (Xia et al., 2010; Lingua et al., 2016).

Los estudios actuales relacionados con la composición fenólica están mayoritariamente enfocados en variedades tintas. Sin embargo, diferentes estudios han reportado la importancia de estos compuestos en uvas y vinos blancos. Por lo tanto, el análisis de la composición fenólica de uvas y vinos de diferentes variedades, se hacen necesarios para ampliar la información existente debido a su gran relevancia tecnológica y para la salud.

1.1. Composición fenólica de uvas y vinos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que se sintetizan en los tejidos vegetales, y que se encuentran en las uvas y en sus productos relacionados, especialmente en el vino (Teixeira et al., 2013). Constituyen una familia heterogénea de compuestos químicos como: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos, cumarinas y lignanos. El estudio de los compuestos fenólicos en alimentos y especialmente en el vino es de gran

interés, ya que están directamente relacionados con atributos de calidad, tales como el color y la astringencia, y además presentan importantes propiedades nutricionales (Pati et al., 2014; Tourtoglou et al., 2014; Lingua et al., 2016).

Los compuestos fenólicos en la uva y en el vino se dividen en dos grandes grupos, el de los flavonoides, como los antocianos (uva tinta), flavanoles y flavonoles; y el de los compuestos no flavonoides como los ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos) y estilbenos, todos ellos bien conocidos por sus fuertes acciones biológicas (Xia et al., 2010). Estos compuestos se reparten en la uva de forma que en la pulpa se encuentran mayoritariamente los compuestos no flavonoides, mientras que los compuestos flavonoides predominan en el hollejo y en las pepitas (Paixão et al., 2007).

La composición fenólica de las uvas está influenciada por diferentes factores externos como las condiciones climáticas, el tipo de suelo, la ubicación geográfica y las prácticas agrícolas, así como también por las características intrínsecas de cada variedad (Waterhouse, 2002). Los compuestos fenólicos se transfieren de la uva al vino durante las operaciones de vinificación, principalmente desde las pieles y semillas, y en las etapas de trituración, maceración y fermentación (Paixão et al., 2007; Lingua et al., 2016; Portu et al., 2016). Esto se refleja directamente en la composición nutricional y sensorial de los vinos producidos. De esta forma, los compuestos fenólicos son responsables de las características organolépticas del vino, como el color, la astringencia, el aroma, el dulzor y la interacción con las proteínas (Waterhouse, 2002; Bell y Henschke, 2005; Paixão et al., 2007; Perestrelo et al., 2012; Portu et al., 2016).

La aparición de estas sustancias en los vinos no es sólo una consecuencia de su extracción de las uvas durante el proceso de vinificación. Así, durante la maceración, antes del proceso de fermentación alcohólica, en el mosto se producen varias reacciones de condensación que involucran a algunas de estas moléculas, como antocianos, catequinas y procianidinas, formándose nuevos pigmentos poliméricos, que son responsables de cambios importantes en el color del vino (Garrido y Borges, 2013).

1.1.1 Compuestos flavonoideos

Los flavonoides son una clase de compuestos fenólicos que presentan una gran diversidad química, constituidos de múltiples anillos aromáticos que poseen grupos hidroxilo. Tienen una estructura básica de 15 átomos de carbono con dos anillos aromáticos unidos a través de una secuencia de 3 átomos de carbono (C6-C3-C6) (Figura 1) (Waterhouse, 2002; Garrido y Borges, 2013). En la planta, juegan un papel fundamental en el crecimiento, la fertilidad y la reproducción y en diversas reacciones de defensa, para protegerse contra factores abióticos y bióticos, como el estrés a la exposición a la luz UV y a los ataques de patógenos. También son componentes básicos de pigmentos y contribuyen a las propiedades organolépticas (Lorrain et al., 2003).

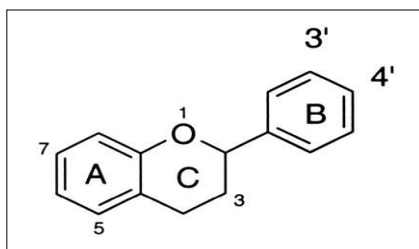


Figura 1. Estructura básica de los flavonoides (Waterhouse, 2002).

Además, estos compuestos que están directamente asociados con las propiedades organolépticas y saludables del consumo de vino (Xia et al., 2010). El conocimiento acerca de la composición en flavonoides del vino ha aumentado considerablemente, y numerosos estudios científicos han revelado sus propiedades biológicas *in vitro* e *in vivo*.

Los efectos de los compuestos flavonoideos están relacionados con su alta capacidad antioxidante, ya que son capaces de capturar e inhibir la producción de una amplia gama de especies reactivas, como el oxígeno reactivo (ROS) y nitrógeno (NO) (Lorrain et al., 2003; Xia et al., 2010; Tourtoglou et al., 2014; Fernandes et al., 2017). Las clases presentes mayoritariamente en las uvas y vinos son los flavanoles y flavonoles, y particularmente en las uvas tintas, predominan los antocianos.

1.1.1.1 Antocianos

Los antocianos son los flavonoides más abundantes y conocidos en las uvas tintas. Son responsables de la coloración del hollejo en los cultivares de uva tinta y rosada. Se acumulan durante el desarrollo de los frutos y proporcionan el color rojo en el vino tinto. Además, estos pigmentos están presentes en la pulpa de las variedades tintoreras (Garrido y Borges, 2013; Lingua et al., 2016).

Hay básicamente cinco antocianos presentes en la uva y en el vino: cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvidina (Figura 2). Los antocianos están presentes en la uva en forma glucosilada, donde en la especie *Vitis vinifera*, se presenta en la forma 3-glucósido, mientras que en las especies e híbridos americanos, se encuentra la forma del 3,5-diglucósido. Esta característica permite identificar el tipo de especie empleada para la elaboración de un vino (Waterhouse, 2002).

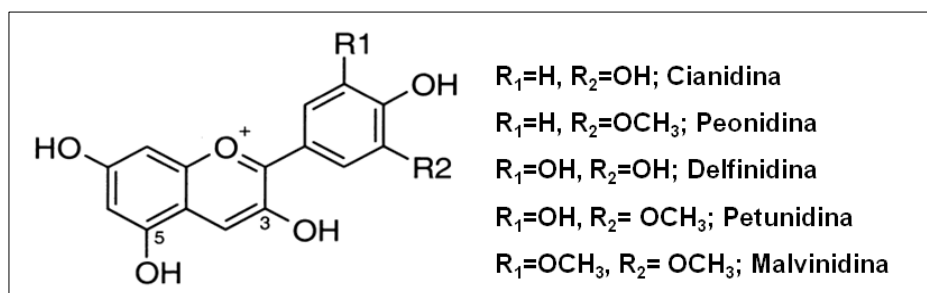


Figura 2. Estructura de los antocianos en uvas y vinos (Waterhouse, 2002).

El contenido y composición de los antocianos de la uva está influenciada por varios factores tales como la variedad, las condiciones edafoclimáticas, especialmente la intensidad luz y la temperatura, y el grado de madurez del fruto (Waterhouse, 2002; Garrido y Borges, 2013). El perfil de antocianos para cada variedad es relativamente estable, mientras que las concentraciones pueden variar ampliamente entre diferentes cosechas, debido a factores ambientales y agronómicos (Garrido y Borges, 2013).

La contribución de los antocianos monoméricos al color del vino disminuye rápidamente durante la fermentación y en el vino joven. Los

antocianos reaccionan con los metabolitos de la fermentación y con otros compuestos fenólicos para formar pigmentos más estables, como pigmentos poliméricos, piranoantocianinas y vitisinas (Garrido y Borges, 2013). Estos compuestos juegan un papel importante en el color y en la estabilidad a largo plazo del vino tinto.

Los antocianos pueden reaccionar con los ácidos fenólicos y los flavanoles, resultando en el fenómeno de la co-pigmentación, formando pigmentos más estables. Por esta razón, los antocianos muestran un color mucho mayor de lo que se esperaría dada su concentración (Waterhouse, 2002). Por lo tanto, el color de los vinos tintos y su evolución, dependen no sólo de la concentración de antocianos, sino también de la concentración de otros compuestos fenólicos.

1.1.1.2 Flavanoles

Los flavanoles o flavan-3-oles, también conocidos como taninos, son compuestos benzopiranos que tienen una cadena de carbono saturada entre C₂ y C₃, con un grupo alcohol en el C₃. Estos compuestos están presentes en el hollejo y en las pepitas de la uva, así como en el vino (Garrido y Borges, 2013; Teixeira et al., 2013). La distribución de los flavanoles en las bayas es distinta entre variedades, y se encuentran en una amplia gama de concentraciones en la semilla y en el hollejo (Waterhouse, 2002; Montealegre et al., 2006; Perestrelo et al., 2012; Vazallo-Valleumbrocio et al., 2017).

Los flavanoles más abundantes son la catequina y su enantiómero, la epicatequina (Figura 3). Estos compuestos se extraen durante el proceso de elaboración del vino (Vazallo-Valleumbrocio et al., 2017). Algunos derivados de la catequina, como la galocatequina, epigalocatequina, galato de epicatequina y galato de epigalocatequina, también se han identificado en uvas y vinos (Garrido y Borges, 2013). En general, en las variedades blancas predomina la catequina (10-20 mg/kg), seguida de la epicatequina (0-10 mg/kg), que en algunos casos, está en tan baja concentración que no es posible cuantificarla, debido al límite de detección de los métodos empleados (Montealegre et al., 2006).

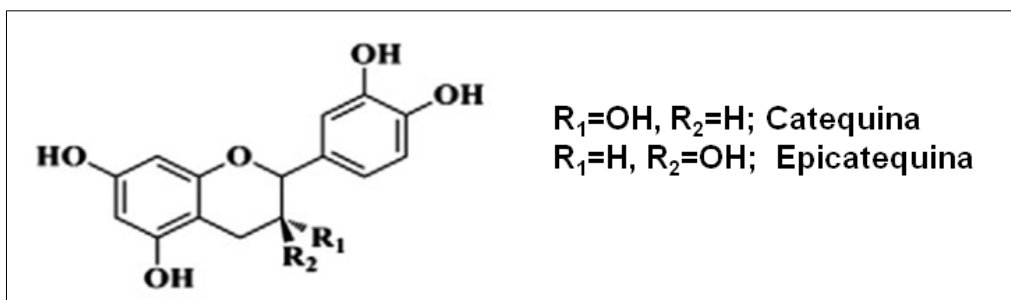


Figura 3. Los flavanoles más abundantes en uvas y vinos (Garrido y Borges, 2013).

Las catequinas monoméricas son las principales responsables de la astringencia, contribuyendo al amargor y a la estructura de los vinos (Montealegre et al., 2006). Durante el envejecimiento, estos compuestos pueden reaccionar con otros componentes del vino, y formar compuestos insolubles y precipitar, característica común en los vinos tintos con mayor tiempo de envejecimiento. En vinos blancos producidos bajo condiciones especiales de fermentación, evitando el contacto prolongado con los hollejos de la uva, se observa que la catequina es el flavanol más abundante, siendo en gran parte responsable del sabor característico del vino (Garrido y Borges, 2013).

1.1.1.3 Flavonoles

Los flavonoles se encuentran en una amplia gama de vegetales. Estos compuestos se localizan en los hollejos de la uva *Vitis vinifera* (Waterhouse et al., 2002; Teixeira et al., 2013; Lingua et al., 2016). Algunos estudios han descrito que en la uva pueden encontrarse monómeros de flavonoles como la quercetina, miricetina, kaempferol, isorhamnetina, siringetina y laricitrina y sus formas glicosiladas (Figura 4) (Montealegre et al., 2006; Jeffery et al., 2008; Garrido y Borges, 2013).

En las variedades tintas se encuentran los glucósidos derivados de las seis agliconas: kaempferol, quercetina, isorhamnetin, miricetina, laricitrina y siringetina. En el vino blanco, sólo se han detectado quercetina, kaempferol e

isorhamnetina, debido a la no expresión de la enzima flavonoide 3', 5'-hidroxilasa en dichas uvas (Jeffery et al., 2008; Flamini et al., 2013; Garrido y Borges, 2013).

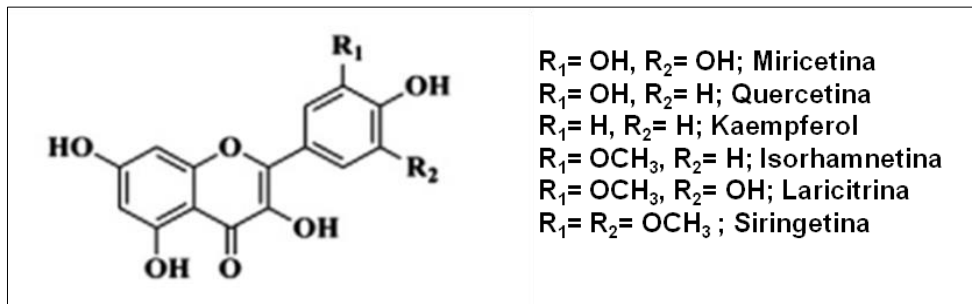


Figura 4. Estructura de los flavonoles (Garrido y Borges, 2013).

La presencia de los flavonoles en el vino es de gran interés pues aportan relevantes características tecnológicas y sensoriales, además de sus propiedades para la salud (Darias-Martín et al., 2000; Jeffery et al., 2008; Xia et al., 2010). Los flavonoles afectan al sabor de los vinos tintos y blancos, ya que contribuyen a las características amargas y astringentes (Montealegre et al., 2006; Perestrelo et al., 2012).

Los flavonoles presentan color amarillo pálido, evidente en su espectro UV/Vis, con un máximo de absorbancia en 350 y 370 nm para los compuestos glucósidos y agliconas, respectivamente. De esa forma confieren el color a los vinos blancos. Además, se cree que los flavonoles reaccionan con los antocianos, estabilizando el color de los vinos tintos (Montealegre et al., 2006; Jeffery et al., 2008).

1.1.2 Compuestos no flavonoideos

La clase de compuestos no flavonoideos está básicamente dividida en ácidos fenólicos y estilbenos. Estos compuestos, a pesar de no contribuir directamente al color de los vinos, son responsables de la conservación del color de los vinos tintos durante el envejecimiento, evitando reacciones de oxidación. Además, presentan diferentes propiedades nutricionales y para la

salud humana (Montealegre et al., 2006; Garrido y Borges, 2013; Lingua et al., 2016).

Los ácidos fenólicos se dividen en dos grupos: ácidos benzoicos y cinámicos. Estos compuestos existen predominantemente como ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, que pueden encontrarse en su forma libre o conjugada. Los estilbenos, aunque se encuentran en concentraciones muy bajas y no contribuyen de manera significativa en los parámetros tecnológicos del vino, presentan una gran importancia para la salud (Waterhouse, 2002; Lorrain et al., 2013; Lingua et al., 2016).

1.1.2.1 Ácidos hidroxibenzoicos

Se han identificado varios tipos de ácidos hidroxibenzoicos tanto en uvas como en vino. Se basan en una estructura C6-C1, con un anillo de benceno con un sustituyente de cadena alifática. El más abundante es el ácido gálico (Figura 5) (Lorrain et al., 2013).

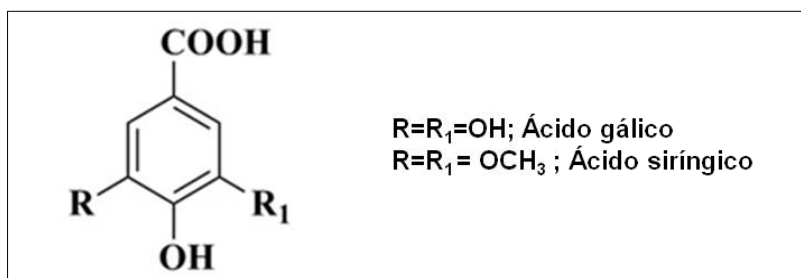


Figura 5. Estructura de los principales ácidos hidroxibenzoicos (Garrido y Borges, 2013).

El ácido gálico se describe como el compuesto fenólico más importante, debido a que es precursor de todos los taninos hidrolizables y se encuentra en los taninos condensados, aunque está en bajas cantidades en vinos jóvenes (Garrido y Borges, 2013). Durante el envejecimiento, el ácido gálico se libera mediante la hidrólisis de ésteres de galato de taninos hidrolizables y taninos condensados. Su estabilidad durante el proceso de envejecimiento es alta,

pues es fácilmente identificado por análisis cromatográfico de vinos tintos con largos tiempos de envejecimiento (Waterhouse, 2002).

1.1.2.2 Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos son una de las clases de ácidos fenólicos más representativas de las encontradas en las uvas y en los vinos. Se han identificado en pequeñas cantidades en forma libre, pero generalmente están esterificados con el ácido tartárico (Lorrain et al., 2013; Teixeira et al., 2013). Los principales ácidos hidroxicinámicos presentes en las uvas y en los vinos son el caftárico, el cutárico y el fertárico (Figura 6). Se encuentran en las formas isoméricas *cis* y *trans*, siendo esta última la más abundante en la naturaleza (Garrido y Borges, 2013).

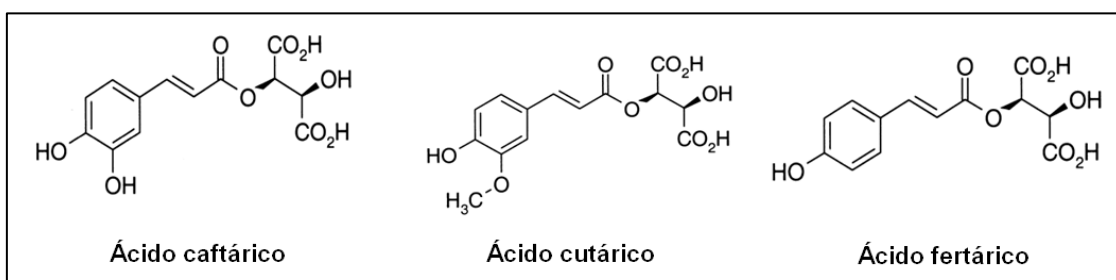


Figura 6. Estructura de los principales ácidos hidroxicinámicos en uvas y vinos (Waterhouse, 2002).

Durante los procesos de vinificación, los ésteres tartáricos se hidrolizan y se liberan los correspondientes ácidos cinámicos: ácidos cafeico, *p*-cumárico y ferúlico (Waterhouse, 2002; Garrido y Borges, 2013). El estudio de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular, durante el envejecimiento de los vinos elaborados con variedades de uva tinta y blanca ha revelado la presencia de varios constituyentes fenólicos en las formas *cis* y *trans* del ácido caftárico, fertárico, cafeico y *p*-cumárico y sus correspondientes ésteres etílicos (Garrido y Borges, 2013).

Los ácidos hidroxicinámicos juegan un papel esencial en las características organolépticas del vino. Son precursores del hidroxi-fenil-piranoantociano, que contribuye de forma significativa a la estabilidad del color del vino. Además, son precursores de etilfenoles, que son compuestos volátiles responsables de la formación de olores desagradables y defectos en los vinos, que se producen principalmente durante el envejecimiento del vino en barricas de roble (Waterhouse, 2002).

Particularmente en el vino blanco, la gran cantidad de ácidos hidroxicinámicos y su susceptibilidad al pardeamiento oxidativo, debido a la oxidación enzimática y/o no enzimática, puede dar lugar a importantes defectos sensoriales. El pardeamiento enzimático ocurre casi por completo en el mosto de uva, cuando el ácido caftarico se oxida a su correspondiente quinona por la acción de la enzima polifenol oxidasa. El glutatión presente en la uva reacciona rápidamente con la quinona, formando el ácido 2-S-glutathionil-cafeoyltartárico, también conocido como “producto de reacción de la uva”, denominado GRP (*Grape Reaction Product*) (Kallithraka et al., 2009; Pati et al., 2014). Después de la fermentación, puede producirse una oxidación no enzimática, en ausencia de la enzima polifenol oxidasa, con la aparición de un color marrón, más o menos intenso, desprendiendo un aroma a madera (Kallithraka et al., 2009; Teixeira et al., 2013).

1.1.2.3 Estilbenos

Los estilbenos son fitoalexinas, cuya biosíntesis por la vid está inducida principalmente como respuesta al estrés de tipo biótico, por medio del ataque de hongos, como *Botrytis cinerea*, y también en respuesta al estrés de tipo abiótico, como la exposición a la luz ultravioleta (Waterhouse, 2002; Flamini et al., 2013). El estilbeno de mayor importancia y más estudiado en uvas y vinos es el resveratrol (3,5,4-trihidroxiestilbeno) (Lorrain et al., 2013).

El resveratrol puede encontrarse en diferentes formas, que incluyen los isómeros *cis* y *trans*, así como también sus formas glucosidadas, denominadas piceido (Figura 7) (Garrido y Borges, 2013). La incidencia de la luz en las plantas puede causar la isomerización *cis-trans*. La concentración total de

estilbenos alcanza aproximadamente 7 mg/l para los vinos tintos y 0,5 mg/l para los vinos blancos (Waterhouse, 2002; Garrido y Borges, 2013). Los derivados del resveratrol se encuentran sólo en la piel de la uva, y eso explica su mayor concentración en los vinos tintos (Lingua et al., 2016).

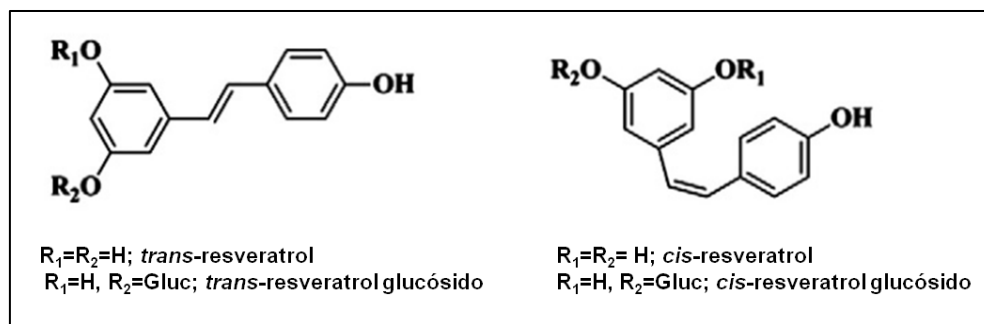


Figura 7. Estilbenos presentes en uvas y vinos (Garrido y Borges, 2013).

A pesar de que el resveratrol y sus derivados no influyen directamente en las características sensoriales de los vinos, tienen una gran importancia en las propiedades para la salud, principalmente por su alta capacidad antioxidante. Estos compuestos presentan un efecto potencial antiproliferativo, mediante la inhibición del desarrollo de diferentes cánceres, además de poseer efectos cardioprotectores, a partir de la mejora del nivel de NO (óxido nítrico) en el plasma sanguíneo, regulando el metabolismo de los lípidos (Waterhouse, 2002; Xia et al., 2010; Garrido y Borges, 2013; Lorrain et al., 2013).

1.2. Aplicación de bioestimulantes en el viñedo

El cambio climático y el impacto de la agricultura para el medio ambiente han propiciado el desarrollo de prácticas agrícolas más sostenibles y respetuosas con el medioambiente. En este sentido, la aplicación de bioestimulantes de tipo orgánico está en auge (Sharma et al., 2014; Frioni et al., 2018). Los bioestimulantes engloban materiales orgánicos de diferentes fuentes naturales que, cuando se aplican en pequeñas cantidades, pueden

generar una mejora en el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Sharma et al., 2014).

Las investigaciones en el área de viticultura se han focalizado en emplear diferentes tipos de bioestimulantes durante el desarrollo de la vid con la finalidad de mejorar la composición química de la uva y evaluar sus efectos sobre los vinos producidos. Estas prácticas tienen como objetivo trabajar con un manejo agrícola más sostenible y además producir vinos con una alta calidad sensorial y nutricional. Dentro de los bioestimulantes más estudiados con el fin de mejorar la composición fenólica, se encuentran el jasmonato de metilo, el quitosano y los extractos de levaduras (Portu et al., 2015 a,b,c; Portu et al., 2016; Gil-Muñoz et al., 2017).

Un producto que está tomando protagonismo en agricultura sostenible es el obtenido en base a extractos de algas marinas, debido a que las algas se encuentran en gran abundancia y su aplicación afecta positivamente a la productividad de diversos cultivos agrícolas (Khan et al., 2012; Sharma et al., 2014). Entre los extractos de algas, el alga marrón *Ascophyllum nodosum* L., destaca por su uso en agricultura, debido a su composición nutricional, disponibilidad comercial y facilidad de aplicación.

Estudios en diferentes variedades de uva revelan que la aplicación de extractos producidos en base a *A. nodosum* tiene impacto positivo en el crecimiento vegetativo y reproductivo, mejorando la calidad de las bayas (Khan et al., 2012; Sabir et al., 2014; Sabir, 2015), con un incremento en el contenido de sólidos solubles (°Brix) (Zermeño-González et al., 2015) y en la concentración de antocianos totales (Frioni et al., 2018). Sin embargo, pocos estudios evalúan el impacto de las aplicaciones foliares de estos extractos en relación a la calidad de la uva, principalmente con relación a la composición fenólica y su influencia sobre las características tecnológicas y sensoriales de los vinos producidos.

Por lo tanto, es importante estudiar la influencia de las aplicaciones foliares de extractos acuosos de *A. nodosum* en vides de diversas variedades en el contenido de compuestos fenólicos de las uvas y de los vinos.

2. Objetivos

En este trabajo se realizó la aplicación foliar del extracto comercial de alga marrón (*Ascophyllum nodosum*) en vides de las variedades Tempranillo tinto y blanco, con el objetivo de estudiar su efecto sobre la composición final de las uvas y vinos, tanto en los parámetros físico-químicos clásicos como en su composición fenólica.

3. Material y métodos

3.1. Tratamientos

Los ensayos de campo consistieron en la aplicación foliar de un extracto comercial del alga *Ascophyllum nodosum* en los viñedos experimentales de las variedades de uva Tempranillo blanco y tinto. Se preparó una disolución acuosa con dos diferentes concentraciones del extracto de algas, una de dosis baja a concentración del 0,25 % (v/v) y otra con una dosis alta del 0,5 % (v/v). A cada disolución de extracto de algas, se le agregó el surfactante Tween 80 a una concentración del 0,1% (v/v). En las plantas control se aplicó una disolución acuosa que contenía sólo Tween 80. Una cantidad total de 200 mL de cada disolución se aplicó foliarmente en cada planta.

La aplicación se llevó a cabo en dos momentos, en el estadio fenológico de envero y una semana después de la primera aplicación. En el ensayo se estableció un diseño experimental completamente aleatorio que constó de tres repeticiones por tratamiento de siete cepas cada una. Las abreviaturas utilizadas para cada muestra son: EA1 para el tratamiento con el extracto de algas a dosis baja (0,25 % v/v) y EA2 para el tratamiento con el extracto de algas a dosis alta (0,5 % v/v).

3.2. Proceso de vinificación

Previo al proceso de cosecha, de cada repetición se tomaron 200 bayas para el análisis de parámetros enológicos del mosto. Alrededor de 50 bayas se

separaron y congelaron a -20°C , para el posterior análisis de la composición fenólica mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para evaluar el efecto de la aplicación del extracto de algas en la calidad del vino, las uvas vendimiadas se estrujaron y despalillaron, y se vinificaron en depósitos de 25 litros, obteniendo tres vinos por cada tratamiento. Para Tempranillo blanco, el mosto se filtró en prensa neumática a una presión de 3,5 bar, para la separación de los hollejos. A los mostos se les añadió metabisulfito de potasio, a una concentración final de 50 mg/L. Luego los mostos se inocularon con una levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Uvaferm VRB, Lallemmand, España) a una concentración de 25 g/hL, y la fermentación alcohólica se llevó a cabo a temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $17\pm 1^{\circ}\text{C}$, para las uvas tintas y blancas, respectivamente.

Para el vino de la variedad Tempranillo tinto, después de la fermentación alcohólica, los hollejos se separaron y cada uno de los vinos se sulfitó e inoculó con una bacteria láctica (Uvaferm BETA, Lallemmand, España), para el desarrollo de la fermentación maloláctica, que se llevó a cabo en una cámara a temperatura controlada de $17\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Los tratamientos se realizaron por triplicado y se produjo un vino de cada réplica. Las muestras de vino se evaluaron de acuerdo con los parámetros físico-químicos, y se congelaron alícuotas, almacenadas a -20°C , para el posterior análisis de los compuestos fenólicos.

3.3. Parámetros generales de las uvas y de los vinos

En las uvas se determinó el pH, la acidez total, el ácido málico y el potasio, mediante los métodos oficiales de la OIV (2003), mientras que el ácido tartárico se determinó siguiendo el método de Rebelein (Lipka y Tanner, 1974). Los antocianos totales se evaluaron mediante el índice de decoloración por dióxido de azufre (Ribéreau-Gayon y Stonestreet, 1965). Los vinos control (sin tratamiento) y los procedentes de los tratamientos con extractos de algas fueron físico-químicamente caracterizados en relación al grado alcohólico, al pH, la acidez total y la intensidad colorante (IC), según los métodos oficiales de la OIV (2003).

La intensidad colorante se calculó como la suma de las absorbancias medidas en las longitudes de onda de 420, 520 y 620 nm para los vinos tintos y de 420 nm en vinos blancos, usando un espectrofotómetro (Shimadzu - modelo UV 1800, Kyoto, Japón). Los compuestos fenólicos totales se expresaron como índice de polifenoles totales (IPT), utilizando una dilución 1:100 de la muestra en agua, mediante lectura en un espectrofotómetro a 280 nm de longitud de onda.

Para la cuantificación del contenido de sulfuroso libre y total (mg/L), ácido láctico, ácido málico, acidez volátil, nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), se empleó el analizador enzimático Miura One (Tecnología Difusión Ibérica, Barcelona, España). Los resultados de estos parámetros enológicos se han expresado como el promedio del análisis de tres muestras (n = 3).

3.4. Determinación de los compuestos fenólicos en uva y vino

3.4.1. Preparación de la muestra para determinar los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos de las uvas se extrajeron según el método propuesto por Niculcea et al. (2013). Las uvas se homogeneizaron con ayuda de un Ultra Turrax T-18 (IKA, Staufen, Alemania) a 18.000 rpm durante 1 minuto, obteniendo una pasta. La muestra homogenizada (1 g) se mezcló con 10 mL de disolución acuosa conteniendo 50% de etanol a pH 2. Luego, las muestras se maceraron en un baño de ultrasonidos (JP Selecta, Barcelona, España) durante una hora, y se centrifugaron a 4.300 rpm a 10 °C durante 15 minutos. El sobrenadante, constituido por el extracto hidroalcohólico, se filtró con filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm y colocados en viales ámbar para su posterior inyección en el cromatógrafo HPLC, con el fin de determinar los compuestos fenólicos.

En el caso del vino, las muestras se inyectaron de forma directa, previa centrifugación a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, y filtración, con filtros PVDF de 0,45 µm.

3.4.2. Análisis de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD

Los extractos de uvas y los vinos fueron analizados en cuanto a su composición en compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector de diodo array (DAD) Agilent 1100 (Palo Alto, EE.UU.). Las muestras, previamente filtradas, se inyectaron en una columna LiChrosphere 100 RP-18 (250 mm x 4 mm diámetro interno, 5 µm de tamaño de partícula).

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron: temperatura del horno 20 °C; volumen de inyección, 25 µL; velocidad de flujo, 1 mL/min. Durante la separación cromatográfica se empleó un gradiente de elución, utilizando una mezcla de fases móviles que se muestra en la Tabla 1.

Las fases móviles utilizadas fueron: fase A, 50 mM de dihidrógeno fosfato de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) a pH 2,6; fase B, 80 % de acetonitrilo y 20 % de fase A (v/v); fase C, 200 mM de ácido *o*-fosfórico a pH 1,5. Los compuestos fenólicos se identificaron de acuerdo al tiempo de retención y al espectro UV-Vis de los patrones disponibles.

Tabla 1. Gradiente de elución empleado para el análisis por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos.

Tiempo	% Fase A	% Fase B	% Fase C
0	100	0	0
5	92	8	0
17	0	14	86
22	0	18	82
29	0	21	79
55	0	33	67
70	0	50	50
78	20	80	0
86	100	0	0

En este método se utilizaron diferentes longitudes de onda en función de las diferentes familias de compuestos fenólicos: ácidos benzoicos y flavan-3-

oles (280 nm), piceido y resveratrol (310 nm), ácidos hidroxicinámicos (320 nm), flavonoles (360 nm) y antocianos (520 nm). Para la cuantificación se usaron las rectas de calibrado de los estándares respectivos (Tabla 2). Cuando un estándar no estaba disponible, la cuantificación se realizó de acuerdo con la recta de calibrado del compuesto más similar. A modo de ejemplo en el Anexo I se presentan los cromatogramas a distintas longitudes de onda, con los respectivos compuestos identificados.

Tabla 2. Datos de calibración usados para la cuantificación por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos.

Compuesto	tr (min)	λ (nm)	Concentración (mg/l)	Tipo de fenol	Recta de calibrado	r^2
Malvidina-3-glc	33,88	520	0-195	Antociano	$y = 73,84x$	0,999
Catequina	20,30	280	0-30	Flavanol	$y = 82,85x$	0,997
Miricetina	48,67	365	0-20	Flavonol	$y = 82,73x$	0,999
Quercetina	59,58	365	0-45	Flavonol	$y = 82,85x$	0,997
Kaempferol	67,19	365	0-10	Flavonol	$y = 82,80x$	0,999
Isorhamnetina	68,39	365	0-10	Flavonol	$y = 73,75x$	0,998
Ácido gálico	9,40	280	0-50	Ácido hidroxibenzoico	$y = 33,35x$	0,991
Ácido cumárico	31,39	320	0-30	Ácido hidroxicinámico	$y = 127,86x$	0,999
Ácido ferúlico	33,89	320	0-10	Ácido hidroxicinámico	$y = 99,55x$	0,997
<i>trans</i> -Piceido	35,20	310	0-80	Estilbeno	$y = 88,52x$	0,998

Nomenclatura: glc, glucósido.

3.5. Análisis estadístico

Los resultados de las diferentes determinaciones se procesaron usando el análisis de la varianza (ANOVA), empleando el programa estadístico SPSS Versión 21.0 para Windows (Chicago, EE.UU.). Los tratamientos y el control se compararon mediante la prueba post hoc de Duncan a $p \leq 0,10$.

4. Resultados y discusión

4.1. Parámetros generales

4.1.1 Uva y vino de Tempranillo tinto

Los parámetros físico-químicos de la uva Tempranillo no sufrieron variaciones importantes como consecuencia de la aplicación foliar del extracto de *Ascophyllum nodosum* (Tabla 3).

En relación al efecto sobre el peso de 100 bayas, la aplicación del extracto no produjo cambios significativos (Tabla 3). En otros trabajos con distintas variedades tintas, la aplicación foliar de otros tipos de bioestimulantes, como extracto de alga verde obtenido a partir de la especie *Chlorella vulgaris* (Nagy y Pintér, 2015), fenilalanina y urea (Portu et al., 2015b, Portu et al. 2017b), jasmonato de metilo (Portu et al., 2015c; Portu et al., 2017a), quitosano y un extracto de levaduras (Portu et al., 2016), tampoco afectaron significativamente al peso de los frutos. Un estudio realizado por Zermeño-González et al. (2015) en el que aplicaron un extracto de algas marinas (*Sargassum spp.*), tanto en las hojas como en el suelo en vides de la variedad Syrah, resultó en un mayor rendimiento de frutos y una mayor concentración de sólidos solubles (°Brix).

Con respecto a los demás parámetros generales, las uvas tintas provenientes de plantas tratadas con la dosis baja del extracto de algas (EA1) presentaron mayor acidez total y mayor contenido de ácido tartárico, comparado con el control (Tabla 3). No se observaron diferencias significativas en relación al resto de los parámetros enológicos. Ese aumento en la acidez no tuvo un efecto significativo en el pH del mosto, debido probablemente al efecto tampón de los otros componentes ácidos presentes en la uva. Nagy y Pintér (2015) estudiaron el efecto de la aplicación foliar del extracto de alga *Chlorella vulgaris* en vides del cultivar Blaufrankish. Estos autores mostraron que la aplicación de esta alga no resultó en cambios significativos en el contenido de sólidos solubles (°Brix), acidez total y pH.

En relación al parámetro nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) en las uvas, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el

control (Tabla 3). Sin embargo, para las vides tratadas con la dosis baja (EA1), las uvas presentaron mayores valores de NFA comparado al tratamiento EA2. En general, los valores de NFA obtenidos fueron superiores a 140 mg N/L, cantidad necesaria para una adecuada fermentación y producción de vinos de calidad (Bell y Henschke, 2005).

Tabla 3. Parámetros enológicos de las bayas de Tempranillo tinto de las vides control y de las vides tratados con extracto de algas.

	Control	EA1	EA2
Peso de 100 bayas (g)	182,40 ± 7,18 a	175,18 ± 31,83 a	180,17 ± 27,43 a
Alcohol probable (% v/v)	14,31 ± 0,24 a	13,61 ± 0,69 a	13,61 ± 0,11 a
pH	3,59 ± 0,03 a	3,54 ± 0,07 a	3,54 ± 0,01 a
Acidez total (g/L)*	4,03 ± 0,19 a	4,45 ± 0,13 b	4,06 ± 0,14 a
Ácido tartárico (g/L)	6,96 ± 0,10 a	7,34 ± 0,21 b	7,03 ± 0,30 ab
Ácido málico (g/L)	1,49 ± 0,11 a	1,63 ± 0,09 a	1,51 ± 0,09 a
Potasio (mg/L)	1694,00 ± 65,09 ab	1757,00 ± 72,99 b	1630,67 ± 49,01 a
NFA (mg N/L)	154,33 ± 35,25 ab	179,33 ± 22,74 b	112,50 ± 12,02 a
Intensidad colorante	5,22 ± 0,42 a	5,19 ± 0,61 a	4,81 ± 0,71 a
Tonalidad	0,49 ± 0,01 a	0,47 ± 0,03 a	0,48 ± 0,03 a
Antocianos (mg/L)	2,21 ± 0,21 a	2,19 ± 0,31 a	2,05 ± 0,03 a
IPT	74,14 ± 3,16 a	71,87 ± 1,67 a	69,78 ± 6,59 a

EA1: dosis baja del extracto de algas; EA2: dosis alta del extracto de algas; NFA: nitrógeno fácilmente asimilable; IPT: índice de polifenoles totales. Los valores se expresan como media y desviación estándar (n=3). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0,10$). * Expresado en g/L de ácido tartárico.

Frioni et al. (2018) estudiaron el efecto de la aplicación de un extracto de *A. nodosum* en vides de las variedades Pinot Noir, Cabernet Franc y Sangiovese, realizado cinco veces durante dos semanas antes del envero. Estos autores no observaron cambios significativos en el rendimiento y en el tamaño de las bayas. Sin embargo, el empleo del extracto de algas en las vides aumentó la acumulación de antocianos totales, determinados mediante espectrofotometría, resultado contrario al observado en nuestro trabajo, ya que no se observaron diferencias entre el control y los dos tratamientos (Tabla 3).

Los vinos tintos producidos a partir de las uvas con los diferentes tratamientos se analizaron de acuerdo con los parámetros enológicos y los resultados se muestran en la Tabla 4. Se observó que para todos los parámetros evaluados, los vinos obtenidos de ambos tratamientos con la aplicación foliar del extracto de algas (EA1 y EA2) no presentaron diferencias significativas en relación al control.

En otros trabajos que estudian la aplicación de otros bioestimulantes en variedades de uva tinta, tales como fenilalanina y urea (Portu et al., 2015a) o jasmonato de metilo (Portu et al., 2015c), tampoco se observaron diferencias significativas en los parámetros enológicos de los vinos. En general, los estudios previos que emplean bioestimulantes en el viñedo han mostrado que, el efecto de estas aplicaciones en los parámetros generales de las uvas y de los vinos tintos suelen ser mínimos, siendo dependientes de las condiciones edafoclimáticas de cada región, así como de las respuestas inter-varietales.

Tabla 4. Parámetros enológicos de los vinos de Tempranillos tintos de las vides control y de las vides tratados con extracto de algas.

	Control	EA1	EA2
Grado alcohólico (% v/v)	14,03 ± 0,31 a	13,82 ± 1,08 a	13,75 ± 0,65 a
pH	3,96 ± 0,01 a	3,94 ± 0,07 a	3,89 ± 0,06 a
Acidez total (g/L)*	4,15 ± 0,08 a	4,24 ± 0,14 a	4,48 ± 0,31 a
Acidez volátil (g/L)**	0,22 ± 0,03 a	0,18 ± 0,05 a	0,22 ± 0,02 a
Ácido málico (g/L)	0,01 ± 0,01 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,01 a
Ácido láctico (g/L)	1,51 ± 0,02 a	1,46 ± 0,11 a	1,46 ± 0,16 a
SO ₂ libre (mg/L)	13,33 ± 1,53 a	12,00 ± 2,65 a	11,00 ± 1,00 a
SO ₂ total (mg/L)	56,67 ± 4,51 a	51,00 ± 5,29 a	56,33 ± 4,93 a
NFA (mg N/L)	19,67 ± 3,06 a	19,67 ± 6,43 a	28,33 ± 12,10 a
Intensidad colorante	7,47 ± 1,18 a	8,20 ± 0,60 a	7,93 ± 1,43 a
IPT	41,33 ± 3,34 a	42,50 ± 1,50 a	41,07 ± 1,98 a

EA1: dosis baja del extracto de algas; EA2: dosis alta del extracto de algas; NFA: nitrógeno fácilmente asimilable; IPT: índice de polifenoles totales. Los valores se expresan como media y desviación estándar (n=3). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,10$). * Expresado en g/L de ácido tartárico; ** Expresado en g/L de ácido acético.

4.1.2 Uva y vino de Tempranillo blanco

Se estudió el efecto de la aplicación del extracto de algas en vides de la variedad Tempranillo blanco sobre las características físico-químicas de las uvas y de los vinos producidos. Los resultados obtenidos mostraron que ambos tratamientos no tuvieron efectos significativos en los parámetros enológicos de las uvas blancas (Tabla 5).

La aplicación del extracto de algas en ambas concentraciones (EA1 y EA2) no produjo una alteración significativa en el peso de los frutos. Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Sabir et al. (2014), que aplicaron de forma foliar un extracto de *A. nodosum* en la variedad de uva blanca Narince durante dos temporadas (2010 y 2011). Sin embargo, la aplicación foliar del extracto del mismo tipo de algas sobre vides de la variedad Feteasca Alba, a una concentración de 0,17 %, resultó en un mayor crecimiento vegetativo de la planta y un mayor tamaño de los frutos (Popescu y Popescu, 2014). Khan et al. (2012) evaluaron la aplicación de una mezcla del extracto de algas (*A. nodosum*) y aminoácidos, en floración y cuajado en vides de la variedad Perlette. Estos autores observaron que las múltiples aplicaciones del bioestimulante resultó en un incremento significativo del peso (14,7 %) y tamaño (7,3 %) de los frutos, así como también un aumento en la concentración de los sólidos solubles (16 %) y del pH (3 %).

Evaluando el parámetro intensidad colorante en las uvas, a partir de los resultados obtenidos se observó que la aplicación del extracto de *A. nodosum* en la dosis alta (EA2) presentó un aumento significativo comparado a la vides sin tratar, mientras que éste no se diferenció del tratamiento aplicado en la dosis baja (EA1) (Tabla 5). Esta diferencia puede estar relacionada con la presencia de compuestos en suspensión, llevando a diferencias en la turbidez, o en la composición de polifenoles, que puede modificar la absorción de luz e interferir en los datos obtenidos por espectrofotometría. Con relación al contenido de nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), la aplicación foliar de la dosis baja (EA1) resultó en una mayor acumulación de nitrógeno comparado al control y al tratamiento con la dosis alta.

Tabla 5. Parámetros enológicos de las bayas de Tempranillo blanco de las vides control y de las vides tratados con extracto de algas.

	Control	EA1	EA2
Peso de 100 bayas (g)	144,03 ± 9,39 a	140,20 ± 3,46 a	140,90 ± 13,80 a
Alcohol probable (% v/v)	13,06 ± 0,21 a	13,09 ± 0,04 a	12,76 ± 0,83 a
pH	3,53 ± 0,04 a	3,55 ± 0,02 a	3,56 ± 0,12 a
Acidez total (g/L)*	5,08 ± 0,42 a	5,00 ± 0,21 a	5,08 ± 0,41 a
Ácido málico (g/L)	2,11 ± 0,27 a	2,17 ± 0,12 a	2,24 ± 0,07 a
Potasio (mg/L)	1628,39 ± 41,54 a	1618,19 ± 77,59 a	1689,69 ± 143,86 a
NFA (mg N/L)	223,00 ± 11,00 a	261,33 ± 21,50 b	220,67 ± 15,89 a
Intensidad colorante	0,84 ± 0,02 a	0,94 ± 0,08 ab	1,09 ± 0,18 b
IPT	10,53 ± 0,46 a	10,63 ± 0,17 a	10,52 ± 0,96 a

EA1: dosis baja del extracto de algas; EA2: dosis alta del extracto de algas; NFA: nitrógeno fácilmente asimilable; IPT: índice de polifenoles totales. Los valores se expresan como media y desviación estándar (n=3). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0,10$). * Expresado en g/L de ácido tartárico.

Actualmente son escasos los trabajos que evalúan el impacto de la aplicación de distintos bioestimulantes en los parámetros enológicos de variedades blancas. Los pocos trabajos existentes se enfocan más en un análisis agronómico, relacionado con datos de productividad y rendimiento de frutos, así como de madurez tecnológica, más que en el impacto en la calidad de los vinos.

Los datos de los parámetros enológicos de los vinos de Tempranillo blanco obtenidos a partir de las uvas de vides tratadas con el extracto de *A. nodosum*, mostraron que la aplicación foliar del alga en las dos concentraciones no tuvo un impacto significativo en las características generales de los vinos (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros enológicos los vinos de Tempranillos blancos de las vides control y de las vides tratados con extracto de algas.

	Control	EA1	EA2
Grado alcohólico (%v/v)	13,20 ± 0,10 a	13,20 ± 0,10 a	12,65 ± 0,57 a
pH	3,32 ± 0,03 a	3,34 ± 0,04 a	3,34 ± 0,10 a
Acidez total (g/L)*	6,51 ± 0,17 a	6,59 ± 0,14 a	6,58 ± 0,35 a
Acidez volátil (g/L)**	0,40 ± 0,06 a	0,41 ± 0,06 a	0,50 ± 0,15 a
Ácido málico (g/L)	1,13 ± 0,11 a	1,07 ± 0,10 a	0,98 ± 0,09 a
Ácido láctico (g/L)	0,02 ± 0,01 a	0,01 ± 0,01 a	0,01 ± 0,02 a
SO ₂ libre (mg/L)	5,00 ± 0,00 a	4,00 ± 1,00 a	4,00 ± 1,00 a
SO ₂ total (mg/L)	50,33 ± 9,07 a	42,67 ± 5,13 a	41,00 ± 3,61 a
NFA (mg N/L)	20,33 ± 11,50 a	36,67 ± 23,71 a	33,67 ± 20,11 a
Intensidad de color	0,09 ± 0,01 a	0,10 ± 0,01 a	0,10 ± 0,01 a
IPT	6,80 ± 0,17 a	7,03 ± 0,15 a	6,80 ± 0,17 a

EA1: dosis baja del extracto de algas; EA2: dosis alta del extracto de algas; NFA: nitrógeno fácilmente asimilable; IPT: índice de polifenoles totales. Los valores se expresan como media y desviación estándar (n=3). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,10$). * Expresado en g/L de ácido tartárico; ** Expresado en g/L de ácido acético.

Todos los vinos obtenidos presentaron características adecuadas para un vino blanco joven. Además, la intensidad colorante, que presentaba diferencias entre los mostos de uvas tratadas con el extracto de algas, después del proceso de vinificación, produjo vinos con una intensidad colorante similar, sin diferencias de valores entre los tratamientos y el control. Cabe señalar que son necesarios más estudios con la variedad Tempranillo blanco y otras variedades blancas, así como observar los efectos del clima y del año sobre las respuestas de cada planta.

4.2 Composición fenólica de uvas y vinos

La composición fenólica de las uvas está condicionada por las características intrínsecas de cada variedad y por otros factores exógenos que pueden afectar al desarrollo de la baya, como son las condiciones climáticas, el

tipo de suelo, y las prácticas agrícolas empleadas, así como la presencia de infecciones y plagas (Garrido y Borges, 2013; Portu et al., 2016). Durante la vinificación, la extracción de estos compuestos y su transferencia al vino puede estar condicionada por las prácticas enológicas, como el tipo de maceración y el sulfitado (Pati et al., 2014; Lingua et al., 2016). Debido al impacto sobre las características sensoriales y tecnológicas del vino, cada vez más la composición fenólica de uvas y vinos son objeto de estudio. De esta forma se hace necesario entender mejor el efecto del empleo de bioestimulantes en la composición fenólica de uvas de variedades distintas.

4.2.1. Variedad Tempranillo blanco

4.2.1.1. Efecto sobre los antocianos en uva y vino de Tempranillo tinto

A partir del análisis por HPLC-DAD se identificaron 14 antocianos, englobando las formas glucosiladas, acetiladas y cumariladas (Tabla 7). Además, para los vinos se identificaron dos compuestos más, la forma acetilada de la cianidina, que no fue posible detectar en las uvas, y la vitisina B, que se genera en el proceso de vinificación (Lorrain et al., 2013).

Los resultados mostraron que la aplicación foliar del extracto de *A. nodosun* sobre las vides de Tempranillo tinto tuvo efecto sobre el contenido de antocianos de las uvas (Tabla 7). El tratamiento aplicado a las vides con la dosis baja del extracto de algas (EA1) incrementó de forma significativa las concentraciones de las formas glucosiladas de petunidina, peonidina y malvidina, y de la forma cumarilada de la malvinidina en las uvas.

Tabla 7. Contenido de antocianos en las muestras de Tempranillo tinto control y tratadas con extracto de algas.

	Uva (mg/kg)			Vino (mg/L)		
	Control	EA1	EA2	Control	EA1	EA2
Delfinidina-3-glc	126,86 ± 16,41 a	222,39 ± 36,84 b	158,66 ± 14,56 a	20,24 ± 1,43 a	19,00 ± 2,22 a	19,08 ± 0,72 a
Cianidina-3-glc	23,13 ± 7,72 a	29,58 ± 8,04 a	24,11 ± 4,50 a	0,96 ± 0,09 a	1,08 ± 0,05 a	2,01 ± 0,10 b
Petunidina-3-glc	93,63 ± 0,96 a	157,78 ± 22,45 b	121,98 ± 3,37 a	30,51 ± 1,74 a	29,85 ± 3,75 a	29,38 ± 1,16 a
Peonidina-3-glc	44,41 ± 7,39 a	61,30 ± 7,03 b	52,74 ± 3,42 ab	4,05 ± 0,18 a	4,03 ± 0,21 a	4,35 ± 0,14 b
Malvidina-3-glc	298,06 ± 10,19 a	469,91 ± 25,86 c	392,22 ± 2,58 b	169,57 ± 4,85 a	179,47 ± 11,46 a	172,04 ± 6,61 a
Delfinidina-3-acglc	9,17 ± 0,34 a	8,50 ± 1,01 a	10,14 ± 0,66 a	1,51 ± 0,12 a	1,44 ± 0,25 a	1,53 ± 0,12 a
Cianidina-3-acglc	n.d.	n.d.	n.d.	0,76 ± 0,06 a	0,96 ± 0,05 b	1,11 ± 0,20 b
Petunidina-3-acglc	7,73 ± 0,14 a	9,24 ± 0,71 b	7,94 ± 0,78 ab	1,58 ± 0,23 a	1,77 ± 0,08 ab	1,96 ± 0,08 b
Peonidina-3-acglc	6,32 ± 1,57 b	3,74 ± 0,22 a	3,52 ± 0,09 a	0,59 ± 0,10 a	0,73 ± 0,04 b	0,52 ± 0,04 a
Malvidina-3-acglc	21,89 ± 0,21 a	26,49 ± 2,26 b	22,12 ± 2,34 ab	9,93 ± 0,42 a	10,48 ± 0,99 a	10,14 ± 0,65 a
Delfinidina-3-cmglc	27,07 ± 0,97 a	37,09 ± 7,18 a	27,87 ± 2,23 a	3,10 ± 0,28 a	3,07 ± 0,56 a	4,33 ± 0,30 b
Cianidina-3-cmglc	6,83 ± 0,34 b	4,95 ± 0,30 a	7,06 ± 0,47 b	1,32 ± 0,22 a	1,46 ± 0,05 a	1,30 ± 0,09 a
Petunidina-3-cmglc	29,52 ± 2,33 ab	36,03 ± 4,77 b	28,77 ± 0,23 a	3,82 ± 0,37 a	3,83 ± 0,37 a	4,13 ± 0,19 a
Peonidina-3-cmglc	13,58 ± 0,18 a	14,67 ± 0,67 a	13,10 ± 1,01 a	1,52 ± 0,01 a	1,88 ± 0,07 b	2,07 ± 0,09 c
Malvidina-3-cmglc	80,65 ± 9,81 a	114,93 ± 10,67 b	100,47 ± 8,87 ab	13,01 ± 0,82 a	14,01 ± 1,90 a	13,57 ± 0,79 a
Vitisina B	n.d.	n.d.	n.d.	1,03 ± 0,06 a	1,09 ± 0,09 a	1,35 ± 0,15 b

Nomenclatura: glc, glucósido; acglc, acetilglucósido; cmglc, *trans-p*-cumaroilglucósido. Los valores se expresan como media y desviación estándar (n=3).

Para cada compuesto, letras distintas indican diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,10$), para uva y para vino. n.d.= no detectado. EA1: dosis baja del extracto de algas; EA2: dosis alta del extracto de algas.

Los tratamientos aplicados en las vides con las dosis baja y alta (EA1 y EA2) aumentaron de forma significativa la concentración total de las formas glucosiladas y cumariladas respecto al control (Figuras 8a-c), incrementándose la concentración total de antocianos (Figura 8-d). Sin embargo, EA1 presentó una mayor cantidad de estos compuestos, mientras que la concentración de peonidina acetilada tuvo una reducción significativa, de cerca del 40%, con la aplicación del extracto de algas en ambas concentraciones (EA1 y EA2).

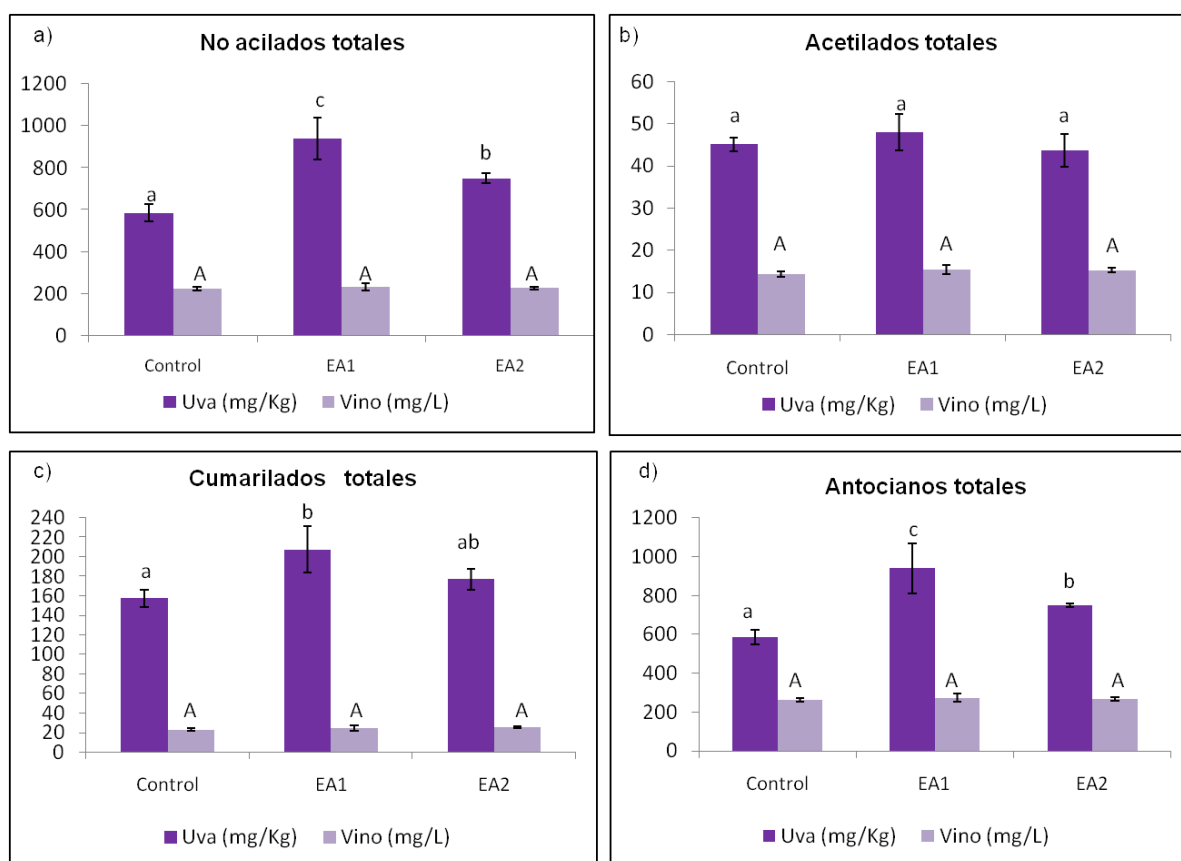


Figura 8. Perfil de antocianos en uva y vino de las vides de Tempranillo tinto control y tratadas con extracto de algas.

Los valores se expresan como media y desviación estándar (n=3). Letras distintas, minúscula (uva) / mayúscula (vino), indican diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,10$). EA1: dosis baja del extracto de algas; EA2: dosis alta del extracto de algas.

La acumulación de antocianos en uva tinta comienza con el envero y alcanza su máximo en las últimas fases de maduración de la fruta, cuando se detiene su síntesis (Teixeira et al., 2013). La presencia de estos

compuestos es predominante en el hollejo, pero también pueden encontrarse en la pulpa en limitados cultivares de vid. Su concentración y composición varía debido a diversos aspectos relacionados con la variedad, las condiciones edafoclimáticas y el manejo agronómico (Garrido y Borges, 2013).

Los resultados mostraron el impacto de la aplicación foliar de los extractos de algas en la acumulación de antocianos en las uvas de la variedad Tempranillo tinto. Otros trabajos evidencian una mayor acumulación de antocianos mediante el empleo de diferentes tipos de bioestimulantes en el cultivo de vides, como urea y fenilalanina (Portu et al., 2015b), jasmonato de metilo (Portu et al., 2015c) y un extracto de levaduras (Portu et al, 2016). Frioni et al. (2018) encontraron una mayor concentración de antocianos en uvas de la variedad Sangiovese, posterior a la aplicación del extracto de *A. nodosum* por cinco veces, empezando dos semanas antes del envero.

Después del proceso de vinificación, se observó que los vinos producidos con las uvas del tratamiento EA2 presentaron un mayor contenido de peonidina en las formas glucosilada y cumarilada, así como de vitisina B (Tabla 7). Ambas concentraciones de extractos de algas (EA1 y EA2) aplicadas resultaron en vinos con mayores concentraciones de cianidina en la forma glucosilada. Sin embargo, evaluando la concentración total de antocianos y sus respectivas formas no glucosiladas, acetiladas y cumariladas, no se observan diferencias entre los tratamientos y el control en los vinos (Figura 8).

Hasta la fecha no se han encontrado trabajos que evalúen el impacto de las aplicaciones de extractos de algas en vides sobre el contenido de antocianos en vinos. Estudios con otros bioestimulantes han mostrado un aumento de la concentración de antocianos en uvas, mientras que en el vino los efectos son variables. En la mayoría de los casos, la concentración de antocianos en el vino es similar al encontrado en el control (Portu et al., 2016). Es probable que las transformaciones que ocurren durante el proceso de vinificación, como la maceración y la fermentación, igualen el contenido de antocianos. Los antocianos juegan un papel fundamental en el color de las uvas tintas y consecuentemente en el vino, siendo la primera

característica sensorial observada por el consumidor, y tienen un impacto importante para la calidad final del vino.

4.2.1.2. Efecto sobre los otros compuestos flavonoideos en uva y vino de Tempranillo tinto

En la Tabla 8 se presenta el contenido de flavanoles y flavonoles que se identificaron en las muestras de uva y vino a partir del control y de los tratamientos con extracto de algas.

Las concentraciones de catequina encontradas variaron entre 239,5 y 283,6 mg/Kg, y de 70,08 y 83,55 mg/L para uvas y vinos, respectivamente. Las uvas no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con extracto de algas y el control, mientras que los vinos obtenidos de los tratamientos con algas mostraron una reducción significativa (Tabla 8).

La catequina es el flavanol predominante en uvas, encontrándose principalmente en el hollejo y en las semillas (Waterhouse, 2002). Este compuesto contribuye a las características sensoriales de los vinos, tales como el color y la astringencia (Garrido y Borges, 2013; Vazallo-Valleumbrocio et al., 2017). Por otro lado, algunos estudios muestran que la aplicación de bioestimulantes y moléculas elicitoras, tales como jasmonato de metilo, quitosano y extracto de levaduras en vides Tempranillo, tampoco afectaron a la concentración de flavanoles en las uvas y en los vinos (Portu et al., 2015c; Portu et al., 2016). La acumulación de flavanoles en las uvas está altamente influenciada por las condiciones climáticas, principalmente por la exposición a la radiación solar y a la temperatura (Teixeira et al., 2013).

Tabla 8. Contenido de flavanoles y flavonoles en las muestras de Tempranillo tinto control y tratadas con extracto de algas.

	Uva (mg/Kg)			Vino (mg/L)		
	Control	EA1	EA2	Control	EA1	EA2
<i>Flavanoles</i>						
Catequina	239,55 ± 12,16 a	283,65 ± 51,80 a	272,58 ± 37,89 a	83,55 ± 2,54 b	72,56 ± 1,19 a	70,08 ± 1,65 a
<i>Flavonoles</i>						
Miricetina-3-galactósido	13,27 ± 5,52 a	14,95 ± 4,61 a	12,72 ± 0,43 a	5,98 ± 0,21 b	5,76 ± 0,33 b	4,77 ± 0,68 a
Miricetina-3- glucósido	23,78 ± 5,90 a	26,28 ± 5,33 a	25,22 ± 0,51 a	10,89 ± 0,47 b	10,96 ± 1,22 b	5,83 ± 1,92 a
Miricetina-3-glucurónido	26,21 ± 9,11 a	29,09 ± 5,17 a	24,43 ± 4,53 a	10,05 ± 2,12 a	11,29 ± 1,15 a	18,01 ± 1,61 b
Quercetina-3-galactósido	3,21 ± 0,35 a	3,47 ± 0,40 ab	4,09 ± 0,50 b	0,84 ± 0,12 a	0,89 ± 0,18 a	1,27 ± 0,14 b
Quercetina-3-glucósido	20,73 ± 5,79 a	21,31 ± 2,10 a	19,49 ± 3,12 a	5,84 ± 0,90 a	5,51 ± 0,50 a	7,66 ± 2,14 a
Miricetina	n.d.	n.d.	n.d.	2,42 ± 0,29 a	2,94 ± 0,30 a	2,47 ± 0,36 a
Quercetina	n.d.	n.d.	n.d.	1,91 ± 0,27 a	2,00 ± 0,28 a	2,12 ± 0,42 a
Kaempferol	n.d.	n.d.	n.d.	0,15 ± 0,03 a	0,27 ± 0,01 a	0,58 ± 0,16 b
Isorhamnetina	n.d.	n.d.	n.d.	0,11 ± 0,03 a	0,13 ± 0,04 a	0,18 ± 0,02 b

Los valores se expresan como media y desviación estándar (n=3). Para cada compuesto, letras distintas indican diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,10$), para uva y para vino. n.d.= no detectado. EA1: dosis baja del extracto de algas; EA2: dosis alta del extracto de algas.

En un estudio publicado por Portu et al. (2017b) en el que evaluaron la influencia de la aplicación foliar de urea y fenilalanina en vides de Tempranillo, se mostraron distintos resultados para la concentración de flavanoles para dos años de cosecha (2014 y 2015). En el primer año, los tratamientos no presentaron diferencias, mientras que en el segundo, las uvas procedentes de los tratamientos con urea presentaron un aumento significativo en la concentración de catequina. Las diferencias de resultados pueden estar relacionadas con las diferencias climáticas entre las cosechas.

Los flavonoles más abundantes en las uvas de la variedad Tempranillo tinto, y consecuentemente en los vinos, fueron miricetina y quercetina y sus respectivas formas conjugadas (Tabla 8). El empleo de la mayor concentración del extracto de algas (EA2) produjo vinos con mayores concentraciones de kaempferol, isorhamnetina, miricetina-3-glucurónido y quercetina-3-galactósido. Sin embargo, estos vinos presentaron una menor concentración de miricetina en las formas galactosilada y glucosilada. Cuando se evaluó el contenido total de flavonoles, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el control, ni para las uvas ni para los vinos (Figura 9).

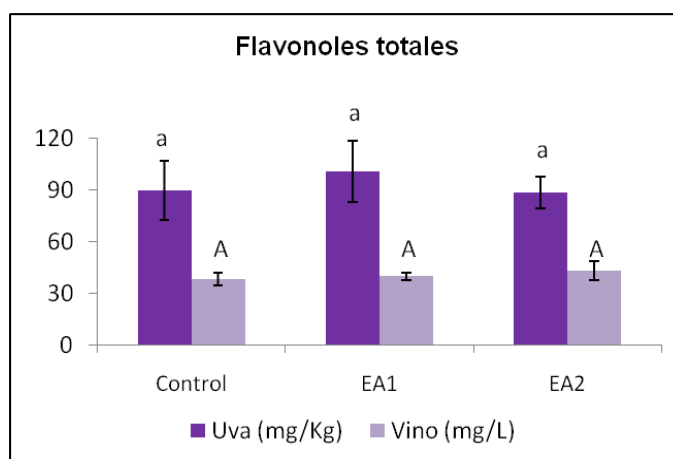


Figura 9. Concentración de flavonoles totales en uva y vino de las vides de Tempranillo tinto control y tratadas con extracto de alga.

Los valores se expresan como media y desviación estándar (n=3). Letras distintas, minúscula (uva) / mayúscula (vino), indican diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,10$). EA1: dosis baja del extracto de algas; EA2: dosis alta del extracto de algas.

Los flavonoles y los antocianos pueden reaccionar para formar pigmentos más estables, característica importante para la estabilidad del color durante la crianza y el envejecimiento de vinos tintos. Así el color de los vinos tintos y su evolución dependen, no sólo de la concentración de antocianos, sino también de los flavonoles presentes (Garrido y Borges, 2013). Por lo tanto, cambios en la concentración de flavonoides, pueden ayudar a una mejor estabilidad del color de los vinos tintos a lo largo de su envejecimiento. No obstante, son necesarios más estudios acerca de la influencia de las condiciones climáticas y de la interacción con los factores agronómicos durante diferentes añadas sobre la acumulación de los flavonoides.

4.2.1.3. Efecto sobre los compuestos no flavonoideos en uva y vino Tempranillo tinto

Los resultados del análisis de los compuestos no flavonoideos por HPLC-DAD de las uvas y de los vino se presentan en la Tabla 9.

En relación a los ácidos hidroxibenzoicos, no fue posible la identificación del ácido gálico en las uvas. En los vinos, se observó que las vides tratadas con la mayor concentración de extracto de algas, dieron lugar a vinos con una menor concentración de ácido gálico que los vinos EA1 y el control. Los tratamientos no alteraron la concentración del ácido sirínico en las uvas. Sin embargo, los vinos presentaron una mayor concentración de este compuesto en las muestras provenientes del tratamiento EA2, seguido por el control y las muestras EA1 (Tabla 9).

Tabla 9. Contenido de compuestos no flavonoideos en muestras de vides de Tempranillo tinto control y tratadas con extracto de algas.

	Uva (mg/Kg)			Vino (mg/L)		
	Control	EA1	EA2	Control	EA1	EA2
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i>						
Ácido gálico	n.d.	n.d.	n.d.	20,70 ± 3,29 b	21,00 ± 2,10 b	16,79 ± 0,52 a
Ácido siríngico	20,63 ± 4,22 a	18,98 ± 5,32 a	18,51 ± 2,48 a	2,42 ± 0,04 b	1,35 ± 0,04 a	3,52 ± 0,13 c
<i>Ácidos hidroxicinámicos</i>						
Ácido <i>cis</i> -caftárico	n.d.	n.d.	n.d.	2,35 ± 0,29 b	1,45 ± 0,18 a	1,56 ± 0,14 a
Ácido <i>trans</i> -caftárico	2,88 ± 0,38 a	3,84 ± 0,51 b	3,30 ± 0,10 ab	30,58 ± 1,67 a	29,88 ± 1,95 a	30,98 ± 0,70 a
Ácido <i>cis</i> -cutárico	n.d.	n.d.	n.d.	4,04 ± 0,15 a	3,96 ± 0,50 a	4,22 ± 0,40 a
Ácido <i>trans</i> -cutárico	n.d.	n.d.	n.d.	21,59 ± 0,90 a	21,20 ± 1,46 a	21,94 ± 0,95 a
Ácido cafeico	1,50 ± 0,12 a	1,62 ± 0,03 ab	1,66 ± 0,11 b	1,93 ± 0,16 a	1,94 ± 0,14 a	2,07 ± 0,25 a
Ácido <i>trans</i> -ferrárico	2,05 ± 0,53 a	2,68 ± 0,97 a	2,57 ± 0,22 a	2,13 ± 0,11 b	2,43 ± 0,23 b	1,65 ± 0,33 a
Ácido cumárico	4,07 ± 0,74 c	1,21 ± 0,12 a	3,26 ± 0,30 b	0,92 ± 0,09 a	1,09 ± 0,04 b	0,86 ± 0,05 a
Ácido ferúlico	10,52 ± 3,07 a	11,79 ± 3,95 a	10,69 ± 1,67 a	4,67 ± 0,18 b	4,56 ± 0,21 b	3,72 ± 0,15 a
<i>Estilbenos</i>						
<i>trans</i> -Piceido	1,60 ± 0,13 a	1,89 ± 0,05 b	2,53 ± 0,03 c	1,67 ± 0,30 a	1,45 ± 0,03 a	1,34 ± 0,25 a
<i>cis</i> -Piceido	0,66 ± 0,02 a	0,97 ± 0,03 b	1,59 ± 0,05 c	0,52 ± 0,07 b	0,34 ± 0,02 a	0,67 ± 0,07 c
<i>trans</i> -Resveratrol	n.d.	n.d.	n.d.	0,24 ± 0,04 a	0,26 ± 0,02 a	0,26 ± 0,01 a

Los valores se expresan como media y desviación estándar (n=3). Para cada compuesto, letras distintas indican diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,10$), para uva y para vino. n.d.= no detectado. EA1: dosis baja del extracto de algas; EA2: dosis alta del extracto de algas.

Los ácidos hidroxicinámicos predominantes en las muestras de uvas fueron *trans*-caftárico, cumárico y ferúlico (Tabla 9). El ácido *trans*-caftárico y el ácido *trans*-fertárico se localizan principalmente en la pulpa, y durante el prensado de la uva, se liberan rápidamente en el mosto. Sin embargo, los isómeros *trans* y *cis* del ácido *p*-cutárico son menos extraíbles, ya que están más localizados en la piel de la uva (Garrido y Borges, 2013). Durante la fermentación alcohólica tiene lugar la hidrólisis de los ácidos hidroxicinámicos, lo que permite la identificación y cuantificación de los correspondientes ácidos libres en el vino (Portu et al., 2016).

Los vinos producidos a partir de las vides tratadas con el extracto de algas (EA1 y EA2) presentaron menores concentraciones del ácido *cis*-caftárico (Tabla 9) que el control. Sin embargo, la aplicación del extracto de algas no resultó en cambios significativos en la concentración total de ácidos hidroxicinámicos, ni en las uvas ni en los vinos (Figura 10a).

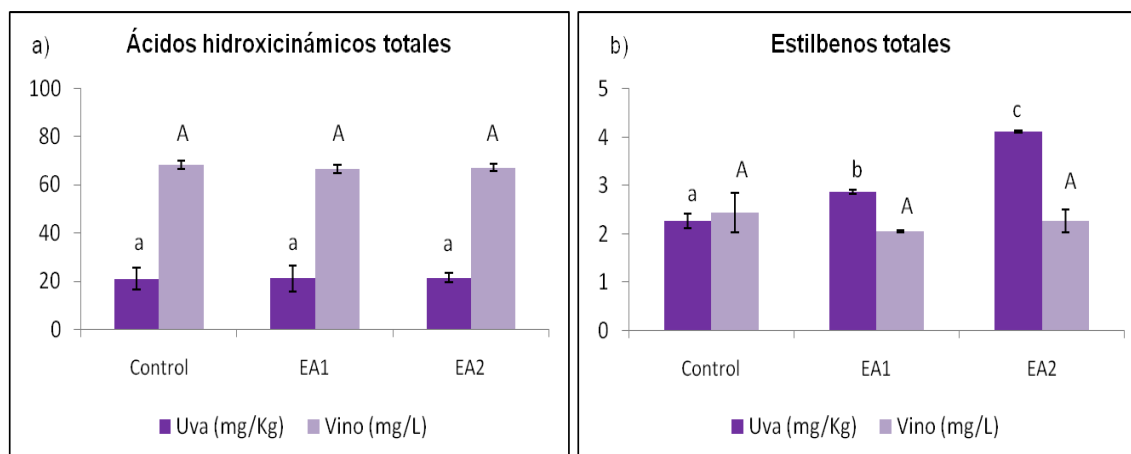


Figura 10. Concentración de compuestos no flavonoideos en uva y vino de las vides de Tempranillo tinto control y tratadas con extracto de algas.

Los valores se expresan como media y desviación estándar (n=3). Letras distintas, minúscula (uva) / mayúscula (vino), indican diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,10$). EA1: dosis baja del extracto de algas; EA2: dosis alta del extracto de algas.

La concentración de los ácidos hidroxicinámicos en vinos tintos pueden tener efecto directo en sus características sensoriales. Estos compuestos son parcialmente responsables del sabor astringente de los

vinos (Garrido y Borges, 2013) y también contribuyen a la estabilidad del color, ya que son precursores de compuestos como los hidroxifenilpiranoantocianos (Portu et al., 2016). Por otro lado, contribuyen a la formación de compuestos responsables de defectos y olores desagradables, que pueden ser producidos durante el envejecimiento del vino en barricas (Chatonnet et al., 1992).

Con respecto a los estilbenos, los tratamientos con extracto de *A. nodosum* tuvieron un gran impacto sobre su acumulación en las uvas. Ambos tratamientos produjeron un aumento significativo en la concentración de las formas *cis/trans*-piceido en las uvas (Tabla 9). El ensayo aplicando la dosis alta del extracto de algas (EA2) proporcionó un aumento del 91,5% del total de estilbenos en las uvas comparado con el control (Figura 10b). En las uvas no fue posible la detección del *trans*-resveratrol. Sin embargo, en las muestras de vino se identificó (Tabla 9), ya que durante la fermentación alcohólica tiene lugar la hidrólisis del *trans*-piceido a *trans*-resveratrol.

Cuando se evalúan los vinos producidos, la diferencia encontrada en las uvas desaparece después del proceso de vinificación, de forma que ambos tratamientos con extracto de algas presentaron resultados similares al control para la concentración de estilbenos (Figura 10b). Sin embargo, cuando se evalúa específicamente la concentración del *cis*-piceido, el vino obtenido del tratamiento EA2 presentó mayor concentración de este compuesto que los demás ensayos (Tabla 9).

Estudios anteriores con la variedad Tempranillo realizados con la aplicación foliar de otros tipos de bioestimulantes, revelan una mayor acumulación de estilbenos en las uvas, pero con efectos variables sobre los vinos (Portu et al., 2015a; Portu et al., 2015c; Portu et al., 2016). Gil-Muñoz et al. (2017) evaluaron el efecto de la aplicación foliar de jasmonato de metilo y extracto de levaduras en variedades de Tempranillo y Monastrell, observando un aumento en la concentración total de estilbenos en los vinos durante la cosecha de 2014. No obstante, en el año posterior los tratamientos no produjeron efectos sobre la acumulación de estilbenos. Por lo tanto otros factores, tanto agronómicos como enológicos, deben tenerse en cuenta para evaluar el efecto de bioestimulantes sobre las

concentraciones de los estilbenos, en vinos obtenidos de diferentes cosechas.

4.2.2. Variedad Tempranillo blanco

Los estudios actuales relacionados con la composición fenólica de vinos están mayoritariamente enfocados en variedades tintas. Sin embargo, diferentes estudios han reportado la importancia de los compuestos fenólicos en los vinos blancos, debido al mayor potencial antioxidante frente a la oxidación lipídica en la circulación sanguínea y su citotoxicidad para algunos tipos de células tumorales (Tourtoglou et al., 2014). Por ello, el análisis de la composición fenólica de vinos blancos debe ser objeto de estudio. Así, la información acerca de la variedad Tempranillo blanco, puede ayudar a ampliar la información sobre estos compuestos de gran relevancia tecnológica y para la salud.

4.2.2.1. Efecto sobre los compuestos flavonoideos en uva y vino de Tempranillo blanco

Con el método de HPLC-DAD fue posible la identificación y cuantificación de sólo un flavanol, la catequina, y dos flavonoles, la quercetina-3-glucósido y la miricetina (Tabla 10).

La aplicación foliar del extracto *A. nodosum* en la dosis alta (EA2) promovió un aumento significativo del contenido de catequina en las uvas de Tempranillo blanco, mientras que la dosis baja (EA1) redujo su concentración respecto al control (Tabla 10). Sin embargo, los vinos producidos no presentaron diferencias entre las muestras tratadas con *A. nodosum* y el control. Tourtoglou et al. (2014) evaluaron siete vinos griegos comerciales de la variedad blanca *Malagousia*, obteniendo valores de catequina de 1 hasta 7 mg/L, valores inferiores a los encontrados en la variedad Tempranillo blanco.

Tabla 10. Contenido de flavanoles y flavonoles en muestras de vides de Tempranillo blanco control y tratadas con extracto de algas.

	Uva (mg/Kg)			Vino (mg/L)		
	Control	EA1	EA2	Control	EA1	EA2
<i>Flavanoles</i>						
Catequina	159,60 ± 16,17 b	112,21 ± 15,27 a	224,10 ± 14,86 c	41,71 ± 1,41 a	43,69 ± 1,67 a	42,71 ± 1,60 a
<i>Flavonoles</i>						
Quercetina-3-glucósido	2,14 ± 0,28 b	1,66 ± 0,20 a	2,75 ± 0,13 c	n.d.	n.d.	n.d.
Miricetina	13,70 ± 4,50 ab	11,45 ± 0,18 a	18,17 ± 4,51 b	n.d.	n.d.	n.d.

Los valores se expresan como media y desviación estándar (n=3). Para cada compuesto, letras distintas indican diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,10$), para uva y para vino. n.d.= no detectado. EA1: dosis baja del extracto de algas; EA2: dosis alta del extracto de algas.

Otros estudios revelan que en vinos blancos producidos en condiciones especiales, evitando un contacto prolongado con la piel de la uva, la catequina es el flavonoide más abundante, y responsable de la astringencia de los vinos (Recamales et al., 2006; Flamini et al., 2013). A partir de técnicas que acoplan espectrometría de masas es posible la identificación de otros compuestos derivados de la catequina, como la galocatequina, epigalocatequina, galato de epicatequina y galato de epigalocatequina (Garrido y Borges, 2013; Pati et al., 2014).

Entre los flavonoles encontrados, se cuantificó la miricetina y la quercetina-3-glucósido en las uvas, mientras que en los vinos no fue posible su identificación y cuantificación (Tabla 10). El empleo del extracto de algas en la dosis alta (EA2) en las vides, resultó en una mayor acumulación de flavonoles totales en las uvas (Figura 11). La imposibilidad de identificación y cuantificación de los flavonoles en los vinos blancos, se debe a que se encuentran mayoritariamente en el hollejo de las uvas, de manera que la cantidad transferida es baja, ya que los hollejos son eliminados antes de la fermentación (Teixeira et al., 2013). Otros estudios que han evaluado vinos blancos por cromatografía tampoco han podido identificar los flavonoles, debido a las bajas concentraciones y al límite de detección de las técnicas (Jeffery et al., 2008; Pati et al., 2014; Tourtoglou et al., 2014).

En algunos vinos blancos, sólo se han detectado quercetina, kaempferol e isorhamnetina, mientras que flavonoles como miricetina, laricitrina y siringetina, están ausentes, debido a la no expresión de la enzima flavonoide 3', 5'-hidroxilasa en algunas variedades de uva blanca (Jeffery et al., 2008; Flamini et al., 2013; Garrido y Borges, 2013). Las condiciones ambientales, como el estrés hídrico (Teixeira et al., 2013), así como el empleo del hollejo durante el proceso de fermentación (Darias-Martin et al., 2000; Fuhrman et al., 2001), pueden resultar en un aumento de la concentración de flavonoles.

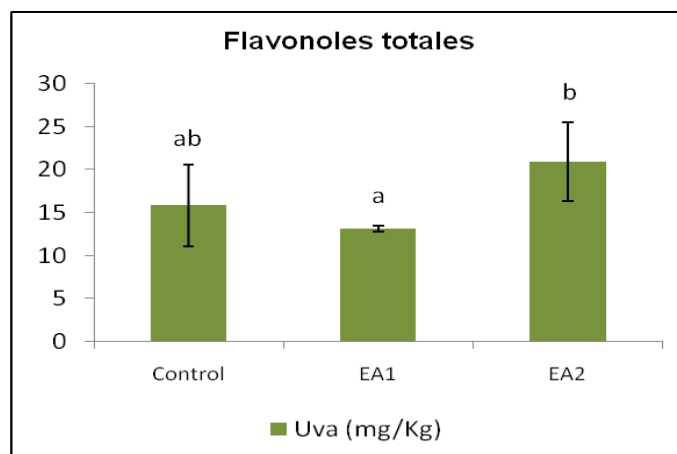


Figura 11. Concentración de flavonoles totales en uva de las vides de Tempranillo blanco control y tratadas con extracto de alga.

Los valores se expresan como media y desviación estándar ($n=3$). Letras distintas indican diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,10$). EA1: dosis baja del extracto de algas; EA2: dosis alta del extracto de algas.

Los flavonoides presentes en las uvas blancas juegan un papel importante en el color, resultando en un color amarillo pálido característico (Montealegre et al., 2006; Jeffery et al., 2008). La presencia de estos compuestos en vinos blancos puede verse influenciada tanto por la variedad de uva como por las prácticas empleadas en el ámbito de la viticultura y del procesamiento enológico.

El proceso de envejecimiento de los vinos afecta a la concentración de los flavonoides, como por ejemplo la catequina, cuya concentración puede disminuir con tiempos largos (de 9 a 12 meses de crianza) (Recamales et al., 2006; Kallithraka et al., 2009). Además, la autooxidación de la catequina puede provocar el cambio de color de los vinos, pues genera los mismos productos que una oxidación enzimática (Recamales et al., 2006). Por lo tanto, es necesaria la evaluación de otros factores, desde agronómicos hasta enológicos, para correlacionar la influencia del uso de bioestimulantes con la composición final de flavonoides presentes en las uvas y en los vinos.

4.2.2.2. Efecto sobre los compuestos no flavonoideos en uva y vino de Tempranillo blanco

Los resultados de los compuestos no flavonoideos presentes en las uvas y en los vinos analizados se presentan en la Tabla 11.

Con respecto a los ácidos hidroxibenzoicos, en las uvas sólo se detectó el ácido siríngico, mientras que en los vinos también fue identificado el ácido gálico. La aplicación foliar con la dosis alta del extracto de *A. nodosum* (EA2) resultó en vinos con una alta concentración de ácido gálico. Sin embargo, el tratamiento EA1 produjo una sutil disminución del contenido en los vinos comparado con el control (Tabla 11). La acumulación del ácido siríngico no estuvo influenciada por el empleo del extracto de algas en las vides, presentando valores que variaron de 2,3 a 2,7 mg/Kg y de 0,4 a 0,5 mg/L, para las uvas y vinos, respectivamente.

En relación a los ácidos hidroxicinámicos, al igual que ocurrió con las muestras de uvas tintas, no fue posible la identificación de las formas *cis*-caftárico y *cis/trans*-cutárico en las uvas blancas. Estos compuestos están presentes mayoritariamente en el hollejo, y se liberan durante la fermentación en el mosto (Garrido y Borges, 2013). Debido a la ausencia del hollejo en el proceso de fermentación empleado para el vino blanco, la concentración de estos compuestos fue baja (Tabla 11). El contenido total de ácidos hidroxicinámicos en las uvas fue mayor con el tratamiento EA2, seguido del control y EA1, mientras que los vinos no presentaron diferencias significativas (Figura 12a).

Tabla 11. Contenido de no flavonoides en muestras de vides de Tempranillo blanco control y tratadas con extracto de algas.

	Uva (mg/Kg)			Vino (mg/L)		
	Control	EA1	EA2	Control	EA1	EA2
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i>						
Ácido gálico	n.d.	n.d.	n.d.	15,66 ± 2,18 b	13,27 ± 0,66 a	25,39 ± 1,17 c
Ácido sirínigico	2,76 ± 0,25 a	2,33 ± 0,14 a	2,55 ± 0,03 a	0,44 ± 0,04 a	0,44 ± 0,09 a	0,50 ± 0,07 a
<i>Ácidos hidroxicinámicos</i>						
Ácido <i>cis</i> -caftárico	n.d.	n.d.	n.d.	2,12 ± 0,18 a	2,08 ± 0,34 a	2,06 ± 0,19 a
Ácido <i>trans</i> -caftárico	2,07 ± 0,28 b	1,55 ± 0,21 a	3,01 ± 0,18 c	26,65 ± 3,24 a	25,71 ± 9,11 a	22,26 ± 2,26 a
Ácido <i>cis</i> -cutárico	n.d.	n.d.	n.d.	3,80 ± 0,04 b	3,72 ± 0,09 b	3,55 ± 0,09 a
Ácido <i>trans</i> -cutárico	n.d.	n.d.	n.d.	7,61 ± 0,45 a	6,86 ± 1,36 a	6,49 ± 1,33 a
Ácido cafeico	0,99 ± 0,06 a	0,91 ± 0,07 a	1,30 ± 0,08 b	1,85 ± 0,05 a	1,98 ± 0,04 ab	2,26 ± 0,37 b
<i>Estilbenos</i>						
<i>trans</i> -Piceido	0,72 ± 0,07 a	0,71 ± 0,02 a	0,66 ± 0,06 a	n.d.	n.d.	n.d.
<i>cis</i> -Piceido	1,27 ± 0,11 a	1,18 ± 0,10 a	1,35 ± 0,28 a	n.d.	n.d.	n.d.

Los valores se expresan como media y desviación estándar (n=3). Para cada compuesto, letras distintas indican diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,10$), para uva y para vino. n.d.= no detectado. EA1: dosis baja del extracto de algas; EA2: dosis alta del extracto de algas.

En los vinos blancos, el ácido *trans*-caftárico fue el ácido hidroxinámico predominante, ya que éste se localiza principalmente en la pulpa, y durante el prensado de la uva, es liberado al mosto (Portu et al., 2016). Los vinos elaborados a partir de las uvas del tratamiento EA2 presentaron una reducción significativa en el contenido de ácido *cis*-cutárico y un aumento en la concentración de ácido cafeico comparado con el control (Tabla 11).

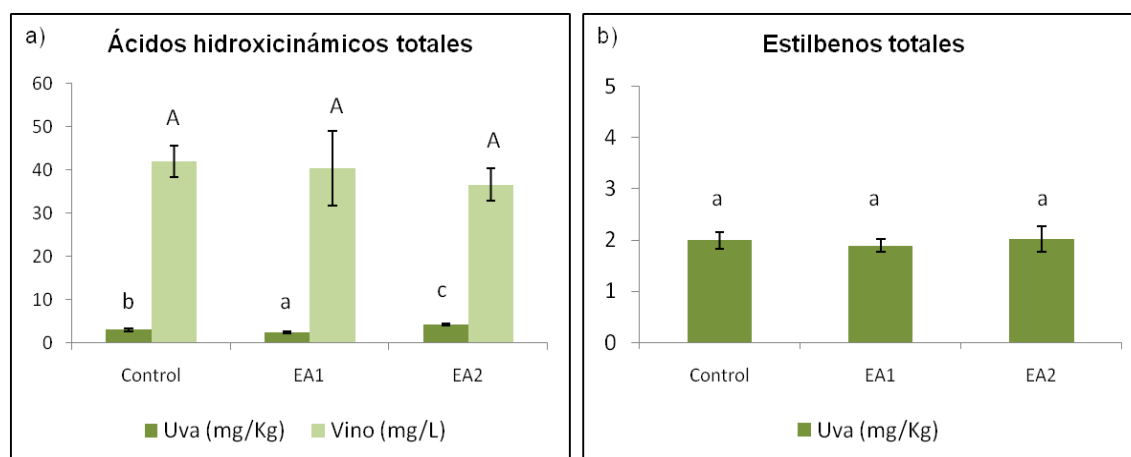


Figura 12. Concentración de no flavonoides totales en uva y vino de las vides de Tempranillo blanco control y tratadas con extracto de alga.

Los valores se expresan como media y desviación estándar (n=3). Letras distintas, minúscula (uva) / mayúscula (vino), indican diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,10$). EA1: dosis baja del extracto de algas; EA2: dosis alta del extracto de algas.

Haciendo una evaluación global del contenido total de ácidos hidroxicinámicos en el vino, ninguno de los tratamientos no se diferenció del control (Figura 12a). En el vino, estos compuestos contribuyen al oscurecimiento del color, ya que son susceptibles al pardeamiento oxidativo, tanto por vía enzimática como no enzimática (Teixeira et al., 2013; Pati et al., 2014). De este modo pueden generar defectos sensoriales, como por ejemplo la aparición de quinonas y productos de condensación, alterando el color y el aroma (Kallithraka et al., 2009; Pati et al., 2014).

En las uvas de Tempranillo blanco se identificaron dos estilbenos, el *trans* y *cis*-piceido, mientras que en los vinos no fue posible su detección

(Tabla 11). El empleo del extracto de algas como bioestimulante, no alteró la concentración total de estilbenos en la uva (Figura 12b). Los estilbenos son fitoalexinas, sintetizadas por las plantas en respuesta al estrés biótico y abiótico (Flamini et al., 2013). Estos compuestos se concentran predominantemente en el hollejo, y su presencia en el vino se debe básicamente al contacto entre los mostos y los hollejos durante la maceración y fermentación (Gil-Muñoz et al., 2017). De esa forma, los vinos tintos tienen mayor cantidad de estos compuestos, seguidos de los vinos rosados, y se presentan como elementos traza en los vinos blancos (Waterhouse, 2002).

Estudios previos sobre diferentes vinos blancos comerciales obtenidos de otras variedades, empleando la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, identificaron los compuestos *cis* y *trans*-piceído (Pati et al., 2014), y el *trans*-resveratrol (Tourtoglou et al., 2014). Asimismo, la presencia de estilbenos en vinos blancos está influenciada tanto por las condiciones agronómicas como por el proceso de vinificación, si hay o no un contacto del hollejo con el mosto.

5. Conclusiones

Este es un estudio pionero que evalúa el impacto de la aplicación del extracto de *Ascophyllum nodosum*, a dos dosis diferentes, sobre la composición fenólica en uvas y vinos obtenidos de vides de las variedades Tempranillo tinto y blanco. Los resultados obtenidos muestran que la aplicación foliar del extracto de algas modificó la composición fenólica de las uvas, con distintos resultados para las variedades Tempranillo tinto y blanco.

La aplicación del extracto de algas en las vides de Tempranillo tinto dio lugar a un aumento de las cantidades de antocianos glucosilados, cumarilados y totales en las uvas, con un mayor efecto al emplear la dosis baja. Sin embargo, la concentración de flavonoides así como las cantidades de ácidos hidroxicinámicos no se vieron afectadas. Por otro lado, el empleo del bioestimulante en ambas dosis aumentó de forma muy importante la

concentración de estilbenos, llegando a un aumento del 95% con la dosis alta. Este resultado es de gran relevancia, debido a que estos compuestos son positivos para la salud. Con respecto a los vinos de Tempranillo tinto, en general, no se observaron cambios en la composición fenólica y en las características enológicas.

En las vides de la variedad Tempranillo blanco, el empleo del bioestimulante a partir del extracto de algas con la dosis alta, resultó en una mayor acumulación de flavonoides totales, especialmente quercetina, que aumentó aproximadamente en un 60%. De la misma forma, los ácidos hidroxicinámicos también aumentaron su concentración con la dosis alta, pero disminuyeron con la dosis baja del extracto de *A. nodosum*. Los demás compuestos no flavonoideos no mostraron alteración. El extracto de algas en las dosis estudiadas no produjo alteración en la composición fenólica ni cambios en los parámetros enológicos en los vinos blancos.

En consecuencia, el conocimiento del impacto del empleo de bioestimulantes en el viñedo en la composición fenólica de los diferentes tipos de variedades de Tempranillo puede emplearse como una herramienta para modular la calidad y la composición fenólica de uvas y vinos.

6. Bibliografía

Bell, S. J., Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242–295.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60, 165–178.

Darias-Martín, J. J., Rodríguez, O., Díaz, E., Lamuela-Raventós, R. M. (2000). Effect of skin contact on the antioxidant phenolics in white wine. *Food Chemistry*, 71 (4), 483–487.

Fernandes, I., Pérez-Gregorio, R., Soares, S., Mateus, N., De Freitas, V., Santos-Buelga, C., Feliciano, A. S. (2017). Wine flavonoids in health and disease prevention. *Molecules*, 22.

Flamini, R., Mattivi, F., De Rosso, M., Arapitsas, P., Bavaresco, L. (2013). Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins , stilbenes and flavonols. *Internacional Journal of Molecular Sciences*, 14, 19651–19669.

Frioni, T., Sabbatini, P., Tombesi, S., Norrie, J., Poni, S., Gatti, M., Palliotti, A. (2018). Effects of a biostimulant derived from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* on ripening dynamics and fruit quality of grapevines. *Scientia Horticulturae*, 232, 97–106.

Fuhrman, B., Volkova, N., Suraski, A., Aviram, M. (2001). White wine with red wine-like properties: Increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (7), 3164–3168.

Garrido, J., Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Research International*, 54 (2), 1844–1858.

Gil-muñoz, R., Fernández-Fernández, J. I., Crespo-Villegas, O., Garde-Cerdán, T. (2017). Elicitors used as a tool to increase stilbenes in grapes and wines. *Food Research International*, 98, 34–39.

Jeffery, D. W., Parker, M., & Smith, P. A. (2008). Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high-performance liquid chromatography. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14, 153–161.

Kallithraka, S., Salacha, M. I., Tzourou, I. (2009). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry*, 113 (2), 500–505.

Khan, A., Ahmad, B., Jaskani, M. J., Ahmad, R., Malik, A. (2012). Foliar application of mixture of amino acids and seaweed (*Ascophylum nodosum*) extract improve growth and physico-chemical properties of grapes. *International Journal of Agriculture & Biology*, 14, 383–388.

Lingua, M. S., Fabani, M. P., Wunderlin, D. A., Baroni, M. V. (2016). From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 208, 228–238.

Lipka, Z., Tanner, H. (1974). Une nouvelle méthode de dosage du acide tartarique dans les moûts, les vins et autres boissons (selon Rebelein). *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture*, 6, 5–10.

Lorrain, B., Ky, I., Pechamat, L., Teissedre, P. L. (2013). Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. *Molecules*, 18(1), 1076–1100.

Mercasa (2017). Distribución Del Consumo De Vinos De Mesa Por Los Hogares Españoles En 2016, Desglosado Por Color Del Vino (En Millones De Litros). En *Statista - The Statistics Portal*, Statista. es.statista.com/estadisticas/474311/consumo-de-los-hogares-de-vinos-de-mesa-en-espana-por-color-de-vino/. Consultado en 25 abril de 2018.

Montealegre, R. R., Peces, R. R., Vozmediano, J. L. C., Martínez Gascueña, J., Romero, E. G. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (6–7), 687–693.

Nagy, P. T., Pintér, T. (2015). Effects of foliar biofertilizer sprays on nutrient uptake, yield, and quality parameters of blaufrankish (*Vitis vinifera* L.) grapes. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 46, 219–227.

Niculcea, M., Martinez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Sánchez-Díaz, M., Morales, F., Ayestarán, B., Antolín, M. C. (2013). Effects of Water-Deficit Irrigation on Hormonal Content and Nitrogen Compounds in Developing Berries of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32 (3), 551–563.

OIV (2003). Compendium of international methods of wine and must analysis (OIV: Paris, France).

Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J. C., Câmara, J. S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105 (1), 204–214.

Pati, S., Crupi, P., Benucci, I., Antonacci, D., Di Luccia, A., & Esti, M. (2014). HPLC-DAD-MS/MS characterization of phenolic compounds in white wine stored without added sulfite. *Food Research International*, 66, 207–215.

Perestrelo, R., Lu, Y., Santos, S. A. O., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., Câmara, J. S., Rocha, S. M. (2012). Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra *Vitis vinifera* L. grape skins by HPLC-DAD-ESI-MS n: Novel phenolic compounds in *Vitis vinifera* L. grape. *Food Chemistry*, 135 (1), 94–104.

Popescu, G. C., Popescu, M. (2014). Effect of the brown Alga *Ascophyllum nodosum* as biofertilizer on vegetative growth in grapevine (*Vitis Vinifera* L.). *Current Trends in Natural Sciences*, 3 (6), 61–67.

Portu, J., González-Arenzana, L., Hermosín-Gutiérrez, I., Santamaría, P., Garde-Cerdán, T. (2015a). Phenylalanine and urea foliar applications to grapevine : Effect on wine phenolic content. *Food Chemistry*, 180, 55–63.

Portu, J., López-Alfaro, I., Gómez-Alonso, S., López, R., Garde-Cerdán, T. (2015b). Changes on grape phenolic composition induced by grapevine foliar applications of phenylalanine and urea. *Food Chemistry*, 180, 171–180.

Portu, J., Santamaria, P., Lopez-alfaro, I., López, R., Garde-cerdán, T. (2015c). Methyl Jasmonate Foliar Application to Tempranillo Vineyard Improved Grape and Wine Phenolic Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 63 (8), 2328–2337.

Portu, J., López, R., Baroja, E., Santamaría, P., Garde-Cerdán, T. (2016). Improvement of grape and wine phenolic content by foliar application to grapevine of three different elicitors: Methyl jasmonate, chitosan, and yeast extract. *Food Chemistry*, 201, 213–221.

Portu, J., López, R., Santamaría, P., Garde-Cerdán, T. (2017a). Elicitation with methyl jasmonate supported by precursor feeding with phenylalanine : Effect on Garnacha grape phenolic content. *Food Chemistry*, 237, 416–422.

Portu, J., Santamaría, P., López, R., Garde-Cerdán, T. (2017b). Phenolic composition of Tempranillo grapes following foliar applications of phenylalanine and urea : A two-year study. *Scientia Horticulturae*, 219, 191–199.

Recamales, Á. F., Sayago, A., González-Miret, M. L., Hernanz, D. (2006). The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Research International*, 39 (2), 220–229.

Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1965). Determination of anthocyanins in red wine. [Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge]. *Bulletin de la Société Chimique de France*, 9, 2649–2652.

Sabir, A. (2015). Improvement of the pollen quality and germination levels in grapes (*Vitis vinifera* L.) by leaf pulverizations with nanosize calcite and

seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*). *Journal of Animal and Plant Sciences*, 25 (6), 1599–1605.

Sabir, A., Yazar, K., Sabir, F., Kara, Z., Yazici, M. A., Goksu, N. (2014). Vine growth, yield, berry quality attributes and leaf nutrient content of grapevines as influenced by seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) and nanosize fertilizer pulverizations. *Scientia Horticulturae*, 175, 1–8.

Sharma, H. S. S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J. R., Martin, T. (2014). Plant biostimulants: A review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology*, 26 (1), 465–490.

Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S. D., Gerós, H. (2013). Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *Internacional Journal of Molecular Sciences*, 14, 18711–18739.

Tourtoglou, C., Nenadis, N., Paraskevopoulou, A. (2014). Phenolic composition and radical scavenging activity of commercial Greek white wines from *Vitis vinifera* L. cv. Malagousia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33 (2), 166–174.

Vazallo-Valleumbrocio, G., Medel-Marabolí, M., Peña-Neira, Á., López-Solís, R., Obrique-Slier, E. (2017). Commercial enological tannins: Characterization and their relative impact on the phenolic and sensory composition of Carménère wine during bottle aging. *LWT - Food Science and Technology*, 83, 172–183.

Waterhouse, A. L. (2002). Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957 (1), 21–36.

Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., Li, H. B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11 (9), 622–646.

Zermeño-González, A., Mendez-López, G., Rodríguez-García, R., Cadena-Zapata, M., Cárdenas-Palomo, J. O..., Catalán-Valencia, E. (2015). Biofertilization of a vineyard and its relationship. *Agrociencia*, 49, 875–887.

ANEXO I – Cromatogramas de los compuestos fenólicos obtenidos por HPLC-DAD a distintas longitudes de onda.

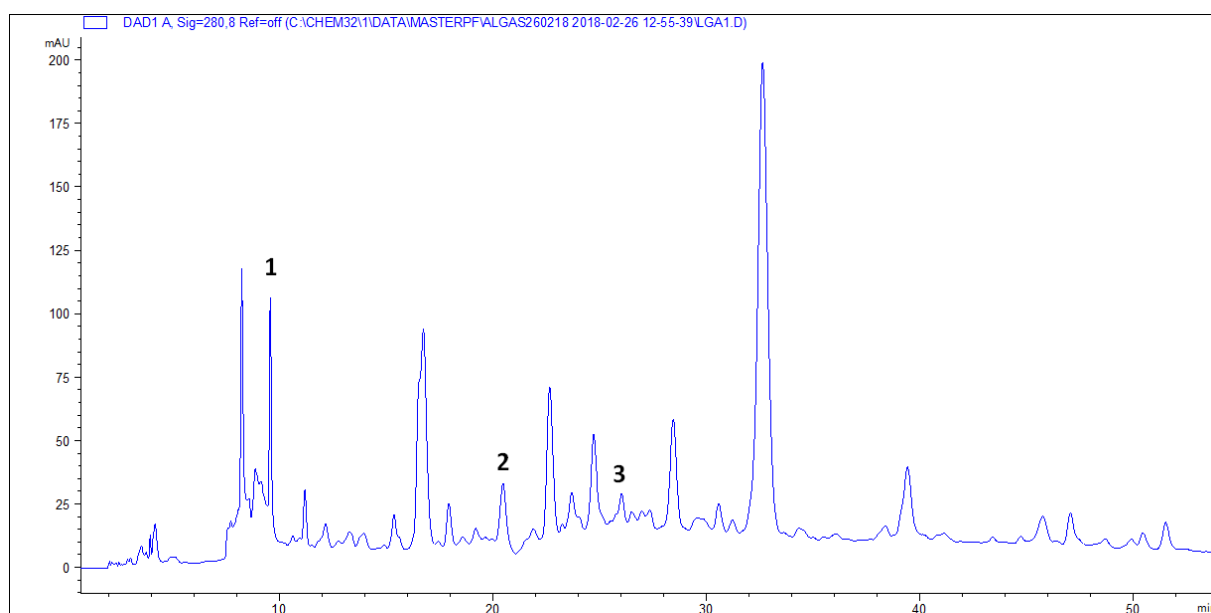


Figura 1A - Cromatograma a 280 nm. 1: ácido gálico, 2: catequina, 3: ácido siríngico.

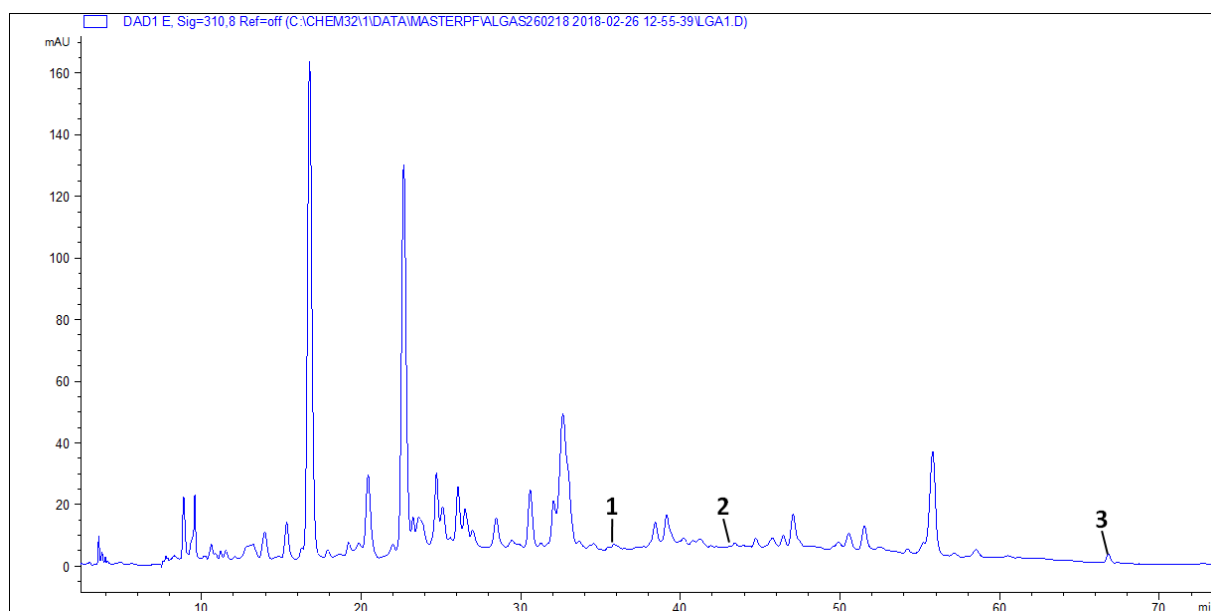


Figura 1B - Cromatograma a 310 nm - 1: *trans*-piceido, 2: *cis*-piceido, 3: *trans*-resveratrol.

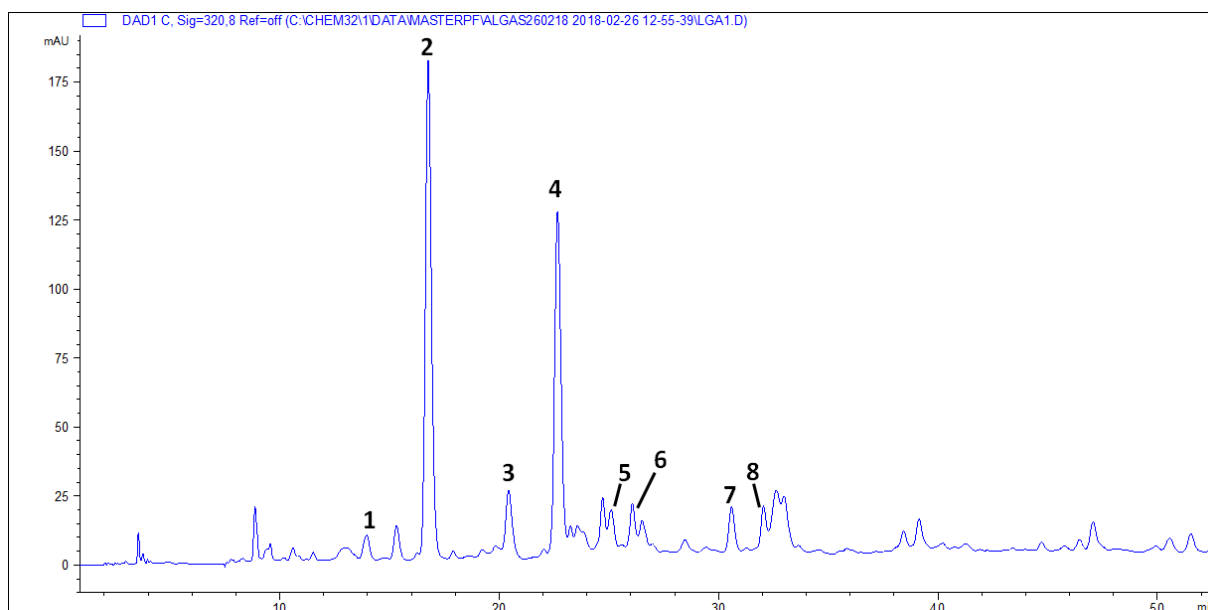


Figura 1C - Cromatograma a 320 nm - 1:ácido *cis*-caftárico, 2: ácido *trans*-caftárico, 3: ácido *cis*-cutárico, 4: ácido *trans*-cutárico, 5: ácido cafeico, 6: ácido *trans*-fertárico, 7: ácido cumárico, 8: ácido ferúlico.

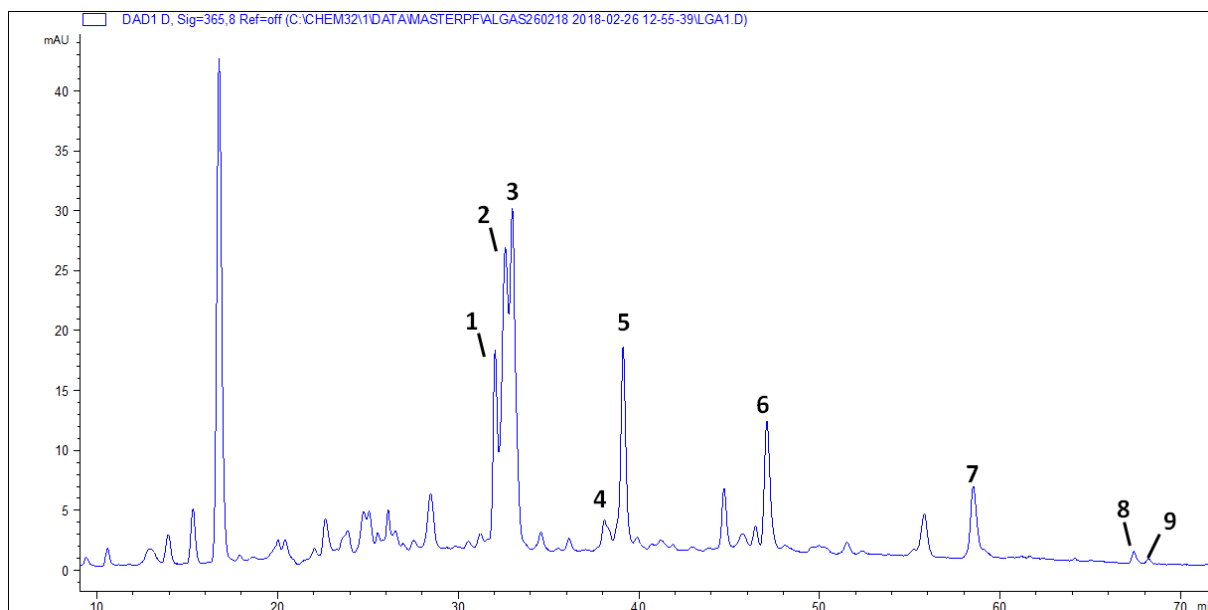


Figura 1D - Cromatograma a 365 nm - 1:miricetina-3-galactósido, 2: miricetina-3-glucósido, 3: miricetina-3-glucuronido, 4: quercetina-3-galactósido, 5: quercetina-3-glucósido, 6: miricetina, 7: quercetina, 8:kaempferol, 9: isorhamnetina.

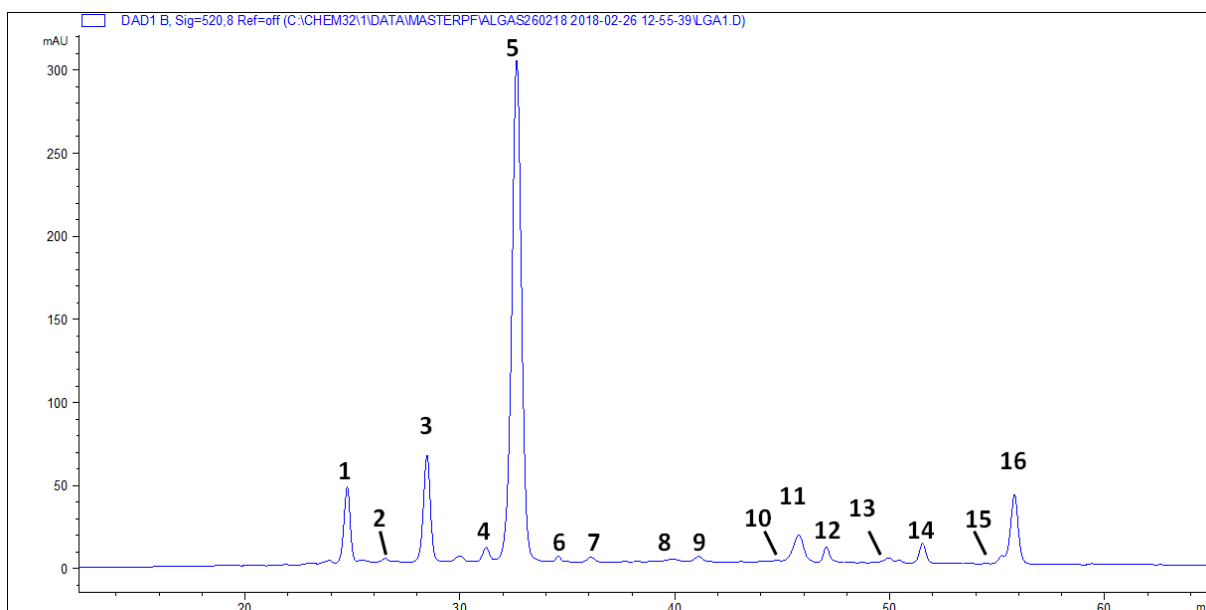


Figura 1E - Cromatograma a 520 nm - 1: delfinidina-3-glc, 2: cianidina-3-glc, 3: petunidina-3-glc, 4: peonidina-3-glc, 5: malvidina-3-glc, 6: vitisina B, 7: delfinidina-3-acglc, 8: cianidina-3-acglc, 9: petunidina-3-acglc, 10: peonidina-3-acglc, 11: malvidina-3-acglc, 12: delfinidina-3-cmglc, 13: cianidina-3-cmglc, 14: petunidina-3-cmglc, 15: peonidina -3-cmglc, 16: malvidina-3-cmglc. *Nomenclatura: glc, glucósido; acglc, acetilglucósido; cmglc, trans-*p*-cumaroilglucósido.